



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Orgánica**

**Derivados de inosina y triazolopirimidinas con  
propiedades terapéuticas de interés. Síntesis y  
evaluación biológica**

**Tesis doctoral**

**Alba Gigante Martínez**

**Instituto de Química Médica (CSIC)**

**Madrid, 2013**









Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Orgánica



Instituto de Química Médica

# **Derivados de inosina y triazolopirimidinas con propiedades terapéuticas de interés. Síntesis y evaluación biológica**

## **MEMORIA**

**Para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por la  
Universidad Autónoma de Madrid**

**ALBA GIGANTE MATÍNEZ**

**Madrid, 2013**

**Directora**

***M<sup>a</sup> Jesús Pérez Pérez***





**Instituto de Química Médica**

Dña. M<sup>a</sup> JESÚS PÉREZ PÉREZ Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA: Que el trabajo reflejado en la Presente Memoria, titulada “Derivados de inosina y triazolopirimidinas con propiedades terapéuticas de interés. Síntesis y evaluación biológica” ha sido realizada en el Instituto de Química Médica (C.S.I.C) por Doña ALBA GIGANTE MARTÍNEZ y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Madrid, 30 de septiembre de 2013

FDO: M<sup>a</sup> Jesús Pérez Pérez

C/ Juan de la Cierva, 3  
28029 MADRID  
Tel: (+34) 91 562 29 00  
Fax: (+34) 91 564 48 53





*A mis padres Crispín e Isabel.*

*A mi hermana Iliana.*

*A mi abuela Adolfina.*

*Y a mi Guanchi.*



El trabajo presentado a lo largo de esta memoria se ha realizado en el Instituto de Química Médica, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Prof. M<sup>a</sup> Jesús Pérez Pérez a quien quiero agradecer la oportunidad que me dio para realizar esta tesis, su confianza y su apoyo.

Esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca JAEPre2009 cofinanciada por el CSIC y el Fondo Social Europeo.

Mi agradecimiento también a Ana, Sonsoles, Eva, Ernesto y M<sup>a</sup> José por toda la ayuda y consejos prestados a lo largo de estos años. Igualmente quiero agradecer al resto del grupo de investigación con los que he coincidido en este tiempo: Pedro, Marta, Aida, Colomer, Susana, Andrés, Sonia, Leire, Elena, María, Alberto, Silvia, Elisa, Lole, Gloria, Eva... Gracias por vuestra ayuda y compañerismo durante esta tesis.

A las Prof. Pilar Goya y María Jesús Pérez Pérez, Directoras del IQM, por la ayuda mostrada en todo momento y al resto del personal de la gerencia y administración del Instituto.

Al personal del laboratorio de instrumental del IQM: Guadalupe, Felipe y Oskía, por su ayuda y la paciencia que han mostrado conmigo a lo largo de estos años; también, a Javier Renau por su colaboración incondicional en mis numerosas dudas informáticas.

Al personal especializado del Centro de Química Orgánica Lora Tamayo, a los servicios de espectrometría de masas, microanálisis y especialmente al servicio de RMN: a la Dra M<sup>a</sup> Luisa Jimeno, a Araceli, Maite, Sergio, Elisa y Pablo, por su servicio impecable y su buen hacer.

Por supuesto, mi agradecimiento a los colaboradores que han realizado la evaluación biológica: a los grupos de los Prof. Jan Balzarini, Sandra Liekens y Johan Neyts, del Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica) y al grupo de los Drs Dolores González-Pacanowska y Luis Miguel Ruiz-Pérez del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) en Granada. Sin ellos no habría sido posible esta tesis doctoral.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia y a mis amigos de siempre su apoyo en todo momento, y por supuesto a mis nuevos amigos, mis compañeros de tesis (IQM), que me han hecho pasar unos años fantásticos.

***Muchísimas gracias a todos***



*“La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás algún día, un descubrimiento científico como el radio, puede llegar a beneficiar a toda la humanidad”*

**Marie Curie**

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”*

**Mahatma Gandhi**



## ÍNDICE

<b>Nota sobre nomenclatura</b>	i
<b>Nota sobre puntuación</b>	i
<b>Abreviaturas</b>	iv

<b>Introducción general</b>	1
-----------------------------	---

### **Capítulo 1. Síntesis de profármacos del inhibidor de timidina fosforilasa 5'-O-tritilinosina. Estudios de estabilidad y solubilidad**

1. Introducción	5
2. Objetivos	13
3. Resultados y discusión	15
4. Conclusiones	35
5. Parte experimental	
5.1. <i>Metódos generales</i>	37
5.2. <i>Síntesis de conjugados tripeptídicos del KIN59</i>	38
5.3. <i>Síntesis de conjugados tetrapeptídicos del KIN59</i>	44
5.4. <i>Síntesis de profármacos de</i> <i>1-[2-amino-(2-etoxi)etoxietil]-5'-O-tritilinosina</i>	47
5.5. <i>Medidas experimentales de solubilidad</i>	49
5.6. <i>Ensayos de estabilidad química en tampón fosfato</i>	49
5.7. <i>Ensayos enzimáticos frente a DPP-IV/CD26 purificada y</i> <i>ensayos en suero humano (SH)</i>	49
5.8. <i>Ensayo CAM en huevos fecundados</i>	50
5.9. <i>Crecimiento tumoral en ratones</i>	50
6. Bibliografía	53

### **Capítulo 2. Síntesis de inosinas 8 sustituidas mediante arilación directa asistida por microondas y su evaluación biológica**

1. Introducción	61
2. Objetivos	69
3. Resultados y discusión	
3.1. <i>Síntesis</i>	71
3.2. <i>Estudios de estabilidad</i>	77
3.3. <i>Evaluación biológica</i>	78

3.4. Medida de fluorescencia	80
4. Conclusiones	85
5. Parte experimental	
5.1. Métodos generales	87
5.2. Síntesis de inosinas 8-sustituidas	88
5.3. Estudios de estabilidad	95
5.4. Estudios de fluorescencia	
5.4.1. Ensayos frente a PNP humana y de procariotas	96
5.4.2. Ensayo frente a PNP de Plasmodium falciparum	96
6. Bibliografía	99

### **Capítulo 3. Enfermedades virales emergentes: derivados heterocíclicos frente al virus chikungunya**

1. Introducción	107
2. Antecedentes	115
3. Objetivos	117
4. Resultados y discusión	
4.1. Modificaciones en la base heterocíclica	119
4.2. Modificaciones en el anillo aromático	121
4.3. Modificaciones en la posición 5 de la base heterocíclica	125
4.4. Modificaciones en el grupo acetilo del cabeza de serie 3.8	131
4.5. Modificaciones en el compuesto 3.28b	136
4.6. Estudios biológicos del cabeza de serie (3.8)	140
5. Conclusiones	143
6. Parte experimental	
6.1. Métodos generales	145
6.2. Síntesis de compuestos con modificaciones en la base heterocíclica	147
6.3. Síntesis de [1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona con modificaciones en el anillo aromático	149
6.4. Síntesis de compuestos modificados en la posición 5 del heterociclo	161
6.5. Síntesis de compuestos modificados en el grupo acetilo del cabeza de serie 3.8	167
6.6. Modificaciones en el compuesto 3.28b	170
6.7. Ensayos de actividad antiviral en células Vero	173
7. Bibliografía	175

<b>Conclusiones generales</b>	<b>181</b>
-------------------------------	------------



## NOTA SOBRE NOMENCLATURA

Con el fin de mantener la misma numeración y facilitar la comparación de los datos espectroscópicos, se le ha dado prioridad a los sustituyentes del nucleósido a lo largo de esta Memoria. Además ha utilizado la nomenclatura de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides").<sup>1</sup> Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de código de tres letras y pertenecen a la serie natural L. En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina *N*-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina *C*-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo *N*-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo *C*-terminal.

## NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005.<sup>2</sup>

---

(1) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>.

(2) <http://buscon.rae.es/dpd>.



## ABREVIATURAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>anh</b>	anhídra
<b>CAM</b>	"Chorioallantoic membrane" assay o ensayo en la membrana corioalantoidea de huevos fecundados
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentración citotóxica 50
<b>CCTLC</b>	Centrifugal circular thin layer chromatography
<b>CD26</b>	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
<b>CDI</b>	1,1-Carbonildiimidazol
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva 50
<b>CE<sub>90</sub></b>	Concentración efectiva 90
<b>CHIKV</b>	Virus Chikungunya
<b>DBU</b>	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
<b>DCC</b>	Diciclohexilcarbodiimida
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DIC</b>	Diisopropilcarbodiimida
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
<b>DMA</b>	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
<b>DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPP-IV</b>	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>EtONa</b>	Etóxido sódico
<b>FGF-2</b>	Factor básico del crecimiento de fibroblastos
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenilmetoxycarbonilo
<b>gCOSY</b>	Gradient-selected Correlation Spectroscopy
<b>GDP</b>	Guanosín 5'-difosfato
<b>gHMBC</b>	Gradient-selected Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
<b>gHSQC</b>	Gradient-selected Heteronuclear Single-Quantum Coherence
<b>GMP</b>	Guanosín 5'-monofosfato
<b>GTP</b>	Guanosín 5'-trifosfato
<b>HATU</b>	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
<b>HCTU</b>	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

<b>HPFC</b>	Cromatografía flash de alta eficacia
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IS</b>	Índice de selectividad, cociente entre $CC_{50}$ y $CE_{50}$
<b><i>K<sub>i</sub></i></b>	Constante de inhibición
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MeONa</b>	Metóxido sódico
<b>MW</b>	Microondas
<b>NMP</b>	<i>N</i> -Metil-2-pirrolidona
<b>NOE</b>	Efecto <i>nuclear</i> Overhauser
<b>PBS</b>	Tampón fosfato
<b><i>Pf</i>PNP</b>	Fosforilasa de nucleósidos de purina del <i>Plasmodium falciparum</i>
<b>PNP</b>	Fosforilasa de nucleósidos de purina
<b>PNP Hyor</b>	Fosforilasa de nucleósidos de purina de <i>Mycoplasma hyorinis</i>
<b>py anh</b>	Piridina anhídrica
<b>PyBOP</b>	Hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-iloxi)tris(pirrolidin)fosfonio
<b>PyBrOP</b>	Hexafluorofosfato de (bromo)tris(pirrolidin)fosfonio
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TF</b>	Timidina fosforilasa
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TOCSY</b>	Espectroscopía de correlación total protón-protón
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>TPPTS</b>	Sal trisódica de tris(3-sulfonatofenil)fosfina
<b>TXPTS</b>	Sal trisódica de tris(4,6-dimetil-3-sulfonatofenil)fosfina
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

Según la IUPAC,<sup>1</sup> la química médica abarca distintos aspectos químicos, biológicos, médicos y farmacéuticos, y se encarga de la invención, descubrimiento, diseño, identificación y preparación de compuestos biológicamente activos, el estudio de su metabolismo, la interpretación de su modo de acción a nivel molecular y la construcción de relaciones estructura-actividad. Esta definición indica el carácter altamente multidisciplinar de la química médica constituyendo un puente entre la ciencia básica de la biología y la química, y la ciencia clínica de la medicina.

En una definición mucho más coloquial, la división de educación de la American Chemical Society<sup>2</sup> considera que la química médica es la aplicación de herramientas químicas a la síntesis de fármacos, destacando también la incorporación de otras disciplinas a la química médica tales como bioquímica o biología molecular, y haciendo especial énfasis en la creación de nuevas moléculas sintéticas.

La presente tesis doctoral, estructurada en tres capítulos, aborda tres problemáticas muy habituales en un laboratorio de química médica. La primera de ellas tiene que ver con la mejora de las propiedades de solubilidad y farmacocinéticas de un compuesto biológicamente activo con la finalidad de mejorar sus propiedades tipo fármaco, en este caso empleando una aproximación “profármaco”. Así, en el capítulo 1 se aborda la síntesis, estudios de estabilidad y solubilidad de profármacos de naturaleza peptídica de la 5'-O-tritilinosina, un nucleósido de purina descrito en nuestro grupo de investigación con potente actividad antiangiogénica.<sup>3,4</sup>

Otra tarea habitual en un laboratorio de química médica es la aplicación de reacciones o metodologías recientemente descritas a compuestos de los que se esperan potenciales propiedades terapéuticas. En el capítulo 2 se ha aplicado una metodología sintética recientemente descrita, la reacción de arilación directa de derivados de purina empleando catálisis mediada por complejos de Pd y Cu<sup>5,6</sup> a la síntesis de inosinas 8-ariladas. Tras la adaptación de las condiciones de reacción y haciendo especial énfasis en la ausencia de restos metálicos en los productos finales, se ha conseguido preparar una serie de 8-aril y 8-piridilinosinas. Como se describirá, estos compuestos, además de su potencial como agentes terapéuticos, presentan propiedades fluorescentes.

Una tercera problemática habitual en química médica es el descubrimiento de nuevas dianas implicadas en enfermedades relevantes, o la aparición de patógenos nuevos o reemergentes frente a los que no se dispone de medicamentos eficaces. En estos casos se requiere de la identificación de compuestos “hit” que son sometidos a un programa sintético con el fin de mejorar su accesibilidad sintética, su potencia inhibitoria, su selectividad o sus propiedades físico-químicas, entre otros muchos parámetros. Esta problemática se aborda en el tercer capítulo de esta tesis donde se describe una nueva familia de triazolopirimidinas como inhibidores de la replicación del virus Chikungunya.

Un hilo conductor común a estos tres capítulos es el tipo de compuestos sintetizados que podrían ser considerados derivados de purinas y análogos. Los dos primeros capítulos son derivados de inosina, nucleósidos de purina menos estudiados que los derivados de adenosina y guanosina. Los derivados de 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidinas del tercer capítulo poseen una considerable analogía estructural con la hipoxantina, la base púrica de la inosina. Como es bien sabido los derivados de nucleósidos constituyen uno de los pilares de la quimioterapia antiviral y anticancerosa, y por ello es en estas áreas terapéuticas donde la presente tesis quedaría enmarcada.

Debido a la variedad en la temática, hemos estructurado esta tesis de modo que cada capítulo tenga entidad propia con su introducción, objetivos, sus resultados y discusión y sus conclusiones, junto a la bibliografía empleada y la correspondiente parte experimental. El trabajo contenido en los tres capítulos se ha ido desarrollando casi en paralelo por lo que el orden de presentación no refleja el orden cronológico de la realización del trabajo. Tras los tres capítulos, hay unas Conclusiones generales de la tesis.

---

(1) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/>.

(2) <http://www.acsmedchem.org/medicinalchemistry.pdf>.

(3) Liekens, S.; Hernandez, A. I.; Ribatti, D.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 29598–29605.

(4) Liekens, S.; Bronckaers, A.; Belleri, M.; Bugatti, A.; Sienaert, R.; Ribatti, D.; Nico, B.; Gigante, A.; Casanova, E.; Opdenakker, G.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; Presta, M. The thymidine phosphorylase inhibitor 5'-O-trityl-inosine (KIN59) is an antiangiogenic multitarget fibroblast growth factor-2 antagonist. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 817–829.

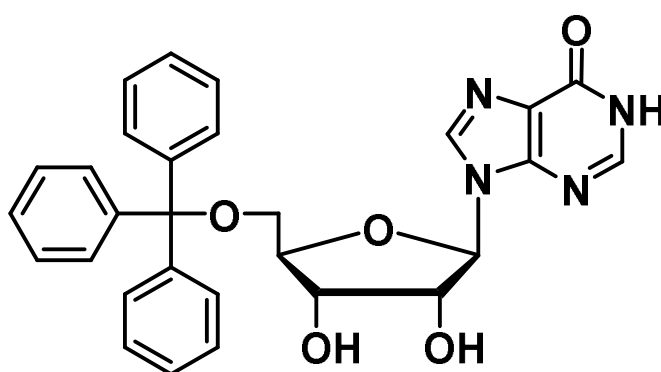
(5) Cerna, I.; Pohl, R.; Hocek, M. The first direct C-H arylation of purine nucleosides. *Chem Commun* **2007**, 4729–4730.

(6) Storr, T. E.; Baumann, C. G.; Thatcher, R. J.; De Ornellas, S.; Whitwood, A. C.; Fairlamb, I. J. S. Pd(0)/Cu(I)-mediated direct arylation of 2'-deoxyadenosines: mechanistic role of Cu(I) and reactivity comparisons with related purine nucleosides. *J Org Chem* **2009**, *74*, 5810–5821.

# Capítulo 1

## Síntesis de profármacos del compuesto antiangiogénico 5'-O-tritilinosina.

Estudios de estabilidad y solubilidad



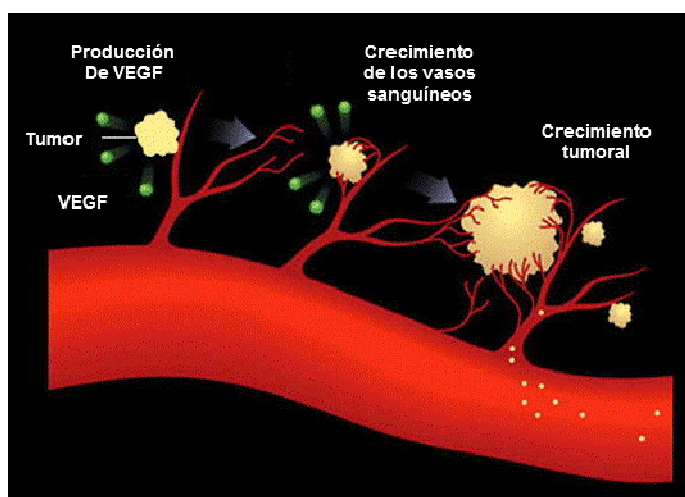
5'-O-Tritilinosina





## 1. INTRODUCCIÓN

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, es un proceso complejo que hoy en día es objeto de numerosos estudios dadas sus implicaciones en el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis.<sup>1,2</sup> El proceso angiogénico (Figura 1.1) comienza con la producción y secreción de diferentes factores de crecimiento, siendo el más conocido el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).<sup>3</sup> Estos factores actúan sobre los receptores de membrana de las células endoteliales, las cuales se activan produciendo unas enzimas proteolíticas que degradan algunas zonas de la membrana basal que recubren los vasos sanguíneos. Las células endoteliales comienzan a migrar y a proliferar a través de los agujeros de la membrana basal hacia el tejido en crecimiento o tumor. A medida que el nuevo vaso sanguíneo crece longitudinalmente, el tejido experimenta una remodelización para disponerse alrededor del nuevo vaso. Estos nuevos vasos formados permiten el suministro de la sangre a los tumores, lo que resulta determinante para su desarrollo, y además, facilitan vías adicionales de diseminación de las células tumorales favoreciendo de ese modo la metástasis en tejidos lejanos del foco tumoral primario. Por ello, la búsqueda de agentes capaces de frenar este proceso es un campo de investigación muy activo y prometedor en la quimioterapia anticancerosa.



**Figura 1.1.** Representación del proceso angiogénico

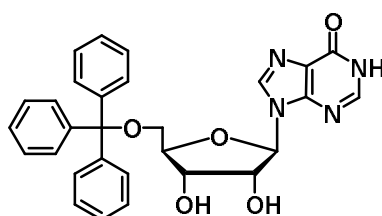
La angiogénesis está regulada por factores proangiogénicos, que la estimulan, y por factores antiangiogénicos, que la inhiben. Uno de los factores proangiogénicos para los que se ha demostrado una correlación entre sus niveles de expresión y el pronóstico desfavorable de distintos tipos de tumores es el factor timidina fosforilasa (TF).<sup>4,5</sup> La timidina fosforilasa es una enzima que se encuentra sobreexpresada en distintos tipos

de procesos tumorales, entre ellos de colon,<sup>6</sup> de estómago,<sup>7</sup> de esófago,<sup>8</sup> de páncreas,<sup>9</sup> carcinomas renales,<sup>10</sup> endometriales,<sup>11</sup> de pecho,<sup>12</sup> de ovario,<sup>13</sup> cervical,<sup>14</sup> de vejiga<sup>15</sup> y de pulmón,<sup>16</sup> provocando un aumento de densidad vascular que además se correlaciona con un pronóstico desfavorable del tumor.<sup>17,18</sup>

El mecanismo por el cual la timidina fosforilasa promueve la angiogénesis es todavía objeto de estudio, si bien parece estar implicada en fenómenos de migración de las células endoteliales.<sup>19,20</sup> La timidina fosforilasa es una enzima del metabolismo de nucleósidos que cataliza la fosforolisis reversible de 2'-desoxinucleósidos de pirimidina y además presenta actividad de fosforribosil transferasa generando un nuevo 2'-desoxinucleósido.<sup>21</sup>

En el año 2004, nuestro grupo de investigación describió un nucleósido de purina, la 5'-O-tritilinosina (**1.1**) o **KIN59** (Figura 1.2), como un inhibidor de la enzima timidina fosforilasa humana.<sup>22</sup> Las numerosas modificaciones estructurales realizadas en distintos puntos de la molécula pusieron de manifiesto la presencia imprescindible del grupo tritilo en la posición 5' de la ribosa para la inhibición de la enzima.<sup>23</sup>

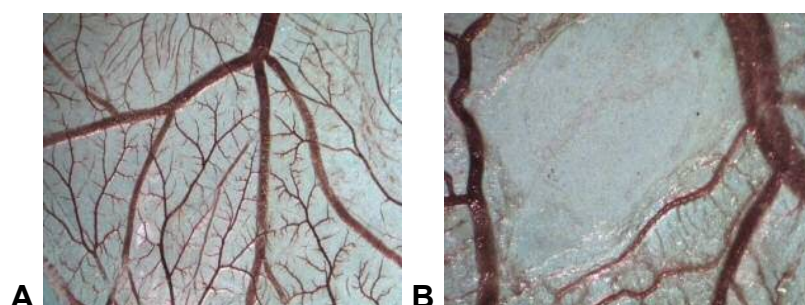
Estudios cinéticos realizados empleando concentraciones variables de los sustratos de la reacción revelaron que el **KIN59** ejerce una inhibición no competitiva respecto a la timidina y al fosfato.<sup>22,24</sup> Por tanto ejercía una inhibición de tipo alostérico, es decir, interacciona con la enzima en un sitio diferente al centro activo, constituyendo el primer ejemplo descrito de inhibidor alostérico de timidina fosforilasa.<sup>22,24,25</sup> Estudios de modelado molecular y mutagénesis dirigida han llevado a proponer que el sitio de unión del **KIN59** en la enzima timidina fosforilasa humana se encuentra en las proximidades del Asp203, localizándose un bolsillo alostérico de carácter fundamentalmente hidrófobo que alojaría al **KIN59**. Estudios de mutagénesis dirigida sobre el Asp203 han puesto de manifiesto que modificaciones en este aminoácido afectan a la actividad catalítica del enzima.<sup>26</sup>



**KIN59 (1.1)**

**Figura 1.2**

Además, el **KIN59** es un potente inhibidor de la angiogénesis promovida por timidina fosforilasa en un ensayo estándar de angiogénesis, denominado ensayo CAM (“chick chorioallantoic membrane” assay).<sup>22</sup> Este experimento, realizado en la membrana coriolantoidea del huevo del pollo, permite tras 2 ó 3 días de incubación, medir el efecto inhibitor o activador de la angiogénesis contabilizando los vasos sanguíneos de la zona de estudio respecto a un experimento control.<sup>27</sup> Como se puede observar en la figura 1.3, la presencia de **KIN59** en el ensayo CAM provoca una clara disminución de la vascularización (Figura 1.3.B) en comparación a un experimento control (Figura 1.3.A).



**Figura 1.3.** Efecto del **KIN59** (B) sobre la angiogénesis promovida por TF en el ensayo CAM frente a un experimento control (A)

El efecto del **KIN59** en este ensayo de angiogénesis es muy llamativo ya que no solo se afecta la formación de los nuevos vasos sanguíneos sino que se crea una zona prácticamente avascular sin que se detecten efectos tóxicos. Esto parecía sugerir que el **KIN59** podría estar actuando sobre otros factores proangiogénicos además de timidina fosforilasa. En 2012 hemos descrito que el **KIN59** no afecta la actividad del VEGF, pero sí es capaz de antagonizar la actividad proangiogénica promovida por el factor básico de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor-2 o FGF-2). Por tanto, podríamos concluir que el **KIN59** es un compuesto multidiana en la farmacología antiangiogénica.<sup>28</sup> La actividad antitumoral del **KIN59** en un modelo de ratón en el que se había inducido el crecimiento de tumores subcutáneos que sobreexpresaban FGF-2 apoyaba el interés de este compuesto. Ahora bien, la baja solubilidad acuosa del **KIN59** complicaba la administración y limitaba la dosis a aplicar (2 aplicaciones diarias en una mezcla PBS/cremophor<sup>®</sup> a una dosis máxima de 15 mg/kilo). Por tanto, era necesario disponer de un análogo de **KIN59** con mejor solubilidad acuosa.

Una de las estrategias más habituales para mejorar la solubilidad de compuestos activos en medios acuosos es la preparación de profármacos, y en particular la unión covalente de un fármaco a un transportador, si bien la unión debe ser lo suficientemente

lábil (por vía química o enzimática) como para permitir la liberación del fármaco en el organismo.<sup>29</sup>

Los aminoácidos han sido ampliamente estudiados como transportadores de fármacos de naturaleza nucleosídica siendo el ejemplo más conocido el valaciclovir, un éster de valina del compuesto antiherpético aciclovir.<sup>30</sup> Estudios muy recientes de nuestro grupo de investigación en profármacos de nucleósidos han puesto de manifiesto que el empleo de oligopéptidos mejora muy notablemente la solubilidad en agua de los profármacos respecto al empleo de un solo aminoácido.<sup>31</sup> Estos oligopéptidos unidos a través de enlaces amidas a fármacos son reconocidos por la enzima endógena dipeptidil-peptidasa tipo IV (DPP-IV/CD26) liberando así el fármaco en su forma activa (Figura 1.4).<sup>32</sup>



Figura 1.4

La enzima DPP-IV/CD26 pertenece a la familia de las prolil-oligopeptidasas y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. Cuando la glicoproteína CD26 se encuentra asociada a membrana se expresa principalmente en células epiteliales, endoteliales y células leucocíticas del sistema inmune. Sin embargo, en su forma soluble la enzima CD26 se encuentra en altas concentraciones en fluidos seminales y en niveles más moderados en el plasma y en el fluido cerebroespinal.<sup>33</sup>

La enzima CD26 muestra una alta especificidad de sustrato, y reconoce e hidroliza secuencias dipeptídicas que contienen una prolina, y en menor medida una alanina, en la penúltima posición (posición P<sub>2</sub>) del extremo N-terminal del oligopéptido (Figura 1.5). Esta limitación favorece la estabilidad del profármaco frente a exopeptidasas no específicas, ya que no es común el reconocimiento de residuos de Pro en la penúltima posición del extremo N-terminal.<sup>34</sup> Otra característica interesante para que se lleve a cabo el reconocimiento por la enzima CD26 es que no contenga una prolina o una hidroxiprolina en la antepenúltima posición (P<sub>3</sub>). Sin embargo, la última posición (P<sub>1</sub>) admite una mayor variedad de aminoácidos siendo los mejor reconocidos los aminoácidos hidrófobos (ej. Val, Ile, Ala, Phe) y los aminoácidos básicos (ej. Lys, Arg, His), siempre que presenten el grupo amino libre.<sup>35</sup>

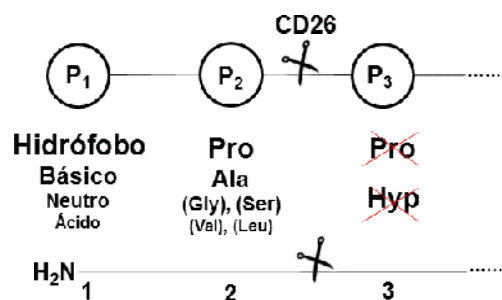


Figura 1.5

La síntesis de profármacos por conjugación de oligopéptidos a fármacos y su liberación por CD26 ha sido extensamente estudiada en nuestro grupo de investigación. Inicialmente se aplicó a fármacos portadores de grupos amino,<sup>32,36,37</sup> ya que la enzima CD26 reconoce enlaces amida. La elección de la secuencia Xaa-Pro ayuda a modular la vida media, la biodisponibilidad y la solubilidad de los distintos profármacos, teniendo en cuenta que el residuo Xaa debe ser un aminoácido preferentemente hidrófobo o de carácter básico. Posteriormente, y para generalizar la aplicabilidad de esta aproximación, se ha adaptado esta estrategia a fármacos portadores de grupos hidroxilos.<sup>38</sup> Para ello, se ha incorporado un nexo de unión entre el fármaco portador de un grupo hidroxilo y el oligopéptido, de modo que la liberación del fármaco se llevaría a cabo por la actuación de la enzima CD26 seguida de una posterior hidrólisis química o enzimática del nexo de unión (Figura 1.6).

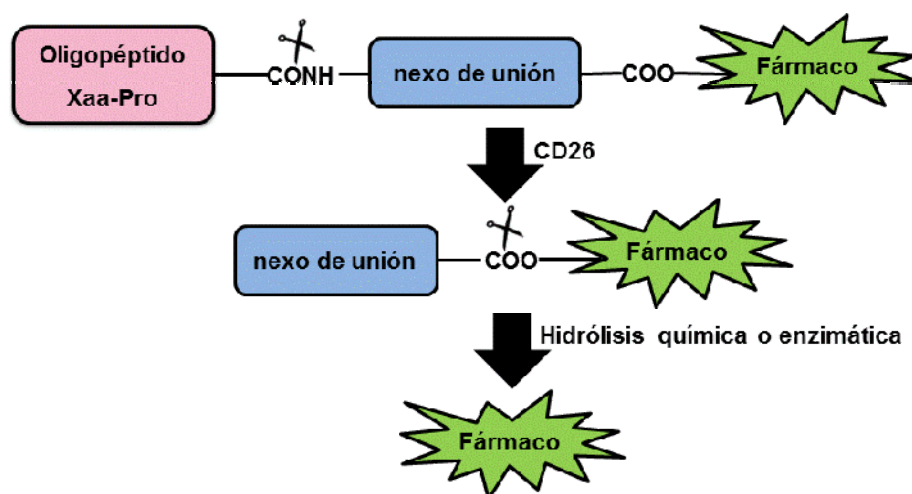


Figura 1.6

En la tesis de Alberto Díez Torrubia,<sup>39</sup> en nuestro grupo de investigación, se estudió con detalle la aplicación de esta estrategia al nucleósido CF1743 (**1.2**), un potente inhibidor del virus varicela zoster, que presentaba baja solubilidad y biodisponibilidad

(Figura 1.7). De los diferentes nexos de unión estudiados entre el OH del nucleósido y el oligopéptido, los mejores resultados se obtuvieron con el empleo de un aminoácido, y en particular la valina.<sup>31</sup> Así, se prepararon distintos derivados tripeptídicos que utilizan la valina como espaciador y un dipéptido terminal para el reconocimiento por CD26. A modo de ejemplo en la figura 1.7 se muestran las secuencias peptídicas de los profármacos que mostraron mejores incrementos de solubilidad ( $\Delta S$ ) respecto al compuesto padre CF1743 (**1.2**). En todos los casos, se pudo demostrar que la incubación en plasma conducía a la liberación del dipéptido terminal por reconocimiento de CD26 e hidrólisis posterior del éster de valina para regenerar el fármaco.

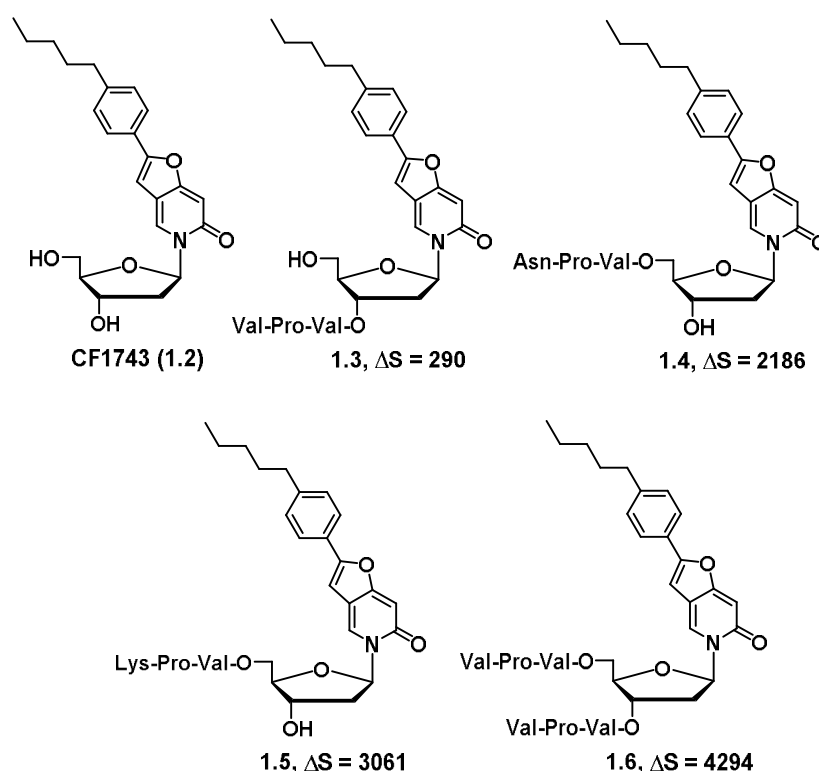


Figura 1.7

Por otro lado, se ensayaron dipéptidos como espaciadores “self-cleavage” entre el OH del nucleósido y la secuencia dipeptídica reconocida por CD26 (Xaa-Pro), dando lugar a tetrapéptidos unidos al OH del nucleósido (Figura 1.8).<sup>40</sup> Además, con esta aproximación se obtuvieron buenos resultados de biodisponibilidad oral “in vivo” tras la administración a ratones.

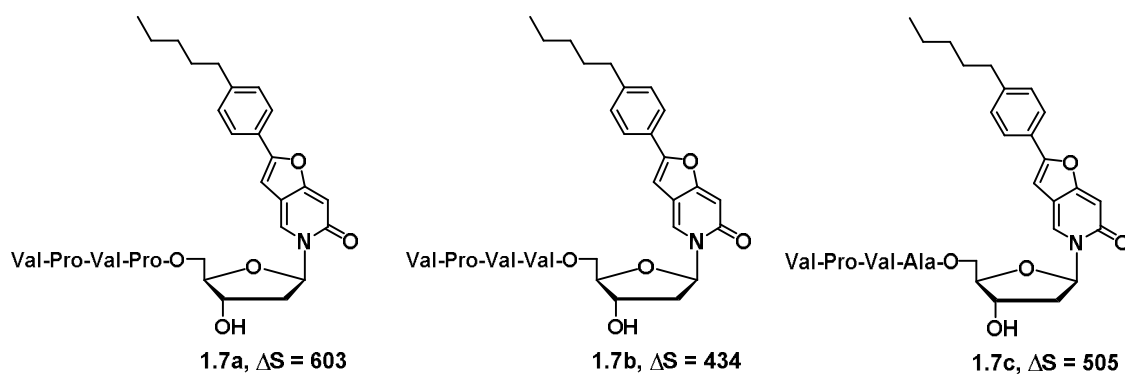
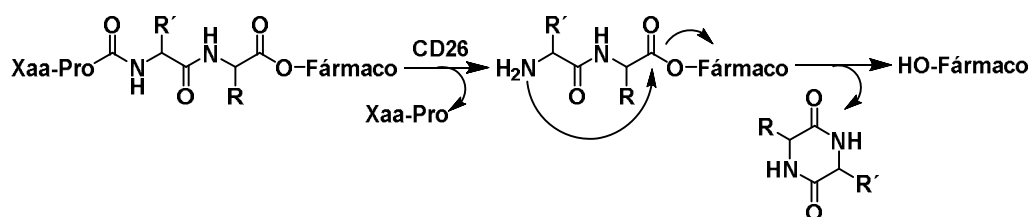


Figura 1.8

En estos casos, la liberación se produce por reconocimiento del dipéptido terminal por CD26 seguido de un ataque intramolecular del grupo amino del dipéptido espaciador al enlace éster del nucleósido liberando el fármaco y la correspondiente dicetopiperazina (Esquema 1.1).



**Esquema 1.1.** Mecanismo de liberación de un fármaco portador de grupo hidroxilo empleando espaciadores “self-cleavage” de naturaleza dipeptídica





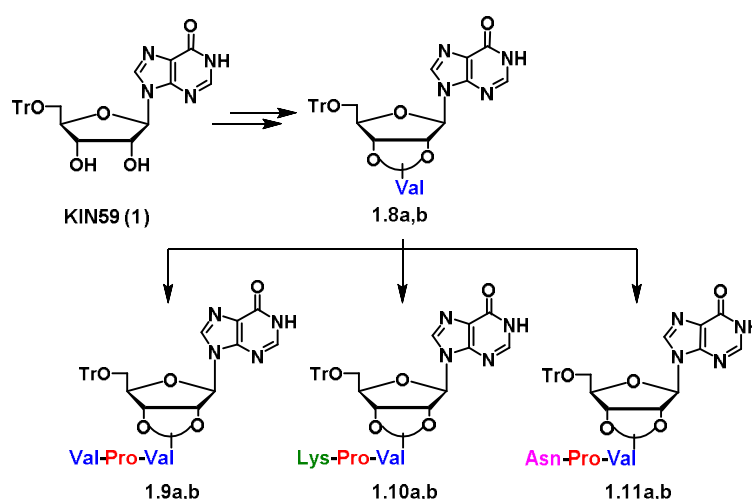
## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo ha sido la preparación de profármacos de naturaleza peptídica del nucleósido antiangiogénico **KIN59** que mejoren la solubilidad acuosa del compuesto. La secuencia peptídica elegida ha estado basada en antecedentes previos del grupo,<sup>39</sup> buscando el reconocimiento del profármaco por la enzima CD26 que reconoce dipéptidos de secuencia Xaa-Pro. Para el anclaje del dipéptido al **KIN59** se han utilizado varias estrategias. Paralelamente a la síntesis se han realizado estudios de solubilidad acuosa, y estudios de estabilidad química y de reconocimiento por CD26.

## *Objetivos*

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

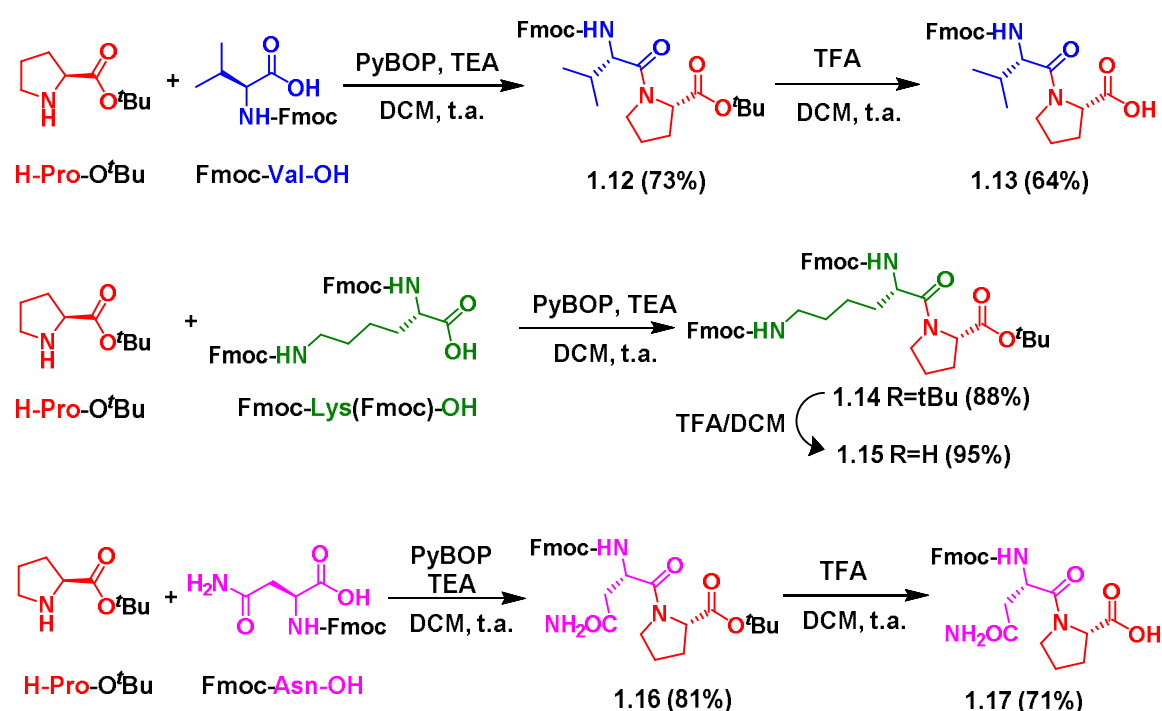
Conforme a lo comentado en la introducción y en función de los resultados previos del grupo, la primera aproximación para preparar profármacos reconocibles por la enzima CD26 sobre los grupos hidroxilo del **KIN59**, consistió en la conjugación de los OHs del nucleósido con un tripéptido, de secuencia terminal Xaa-Pro, donde Xaa será preferentemente Val, Lys y Asn, unida al nucleósido a través de un éster de valina. La elección del resto Xaa ha estado condicionada por su reconocimiento por CD26 y por su contribución a la solubilidad según resultados previos.<sup>31</sup> Hay que resaltar que si bien la conjugación de tripéptidos se había aplicado con anterioridad a hidroxilos secundarios, estos correspondían a 2'-desoxinucleósidos como el CF1743 comentado en la introducción, pero no a ribonucleósidos con dos OHs secundarios como el **KIN59**.<sup>38</sup> Así el primer objetivo consistió en la preparación de monoésteres tripéptidicos del **KIN59**.



**Esquema 1.2.** Estrategia de síntesis de los conjugados tripeptídicos

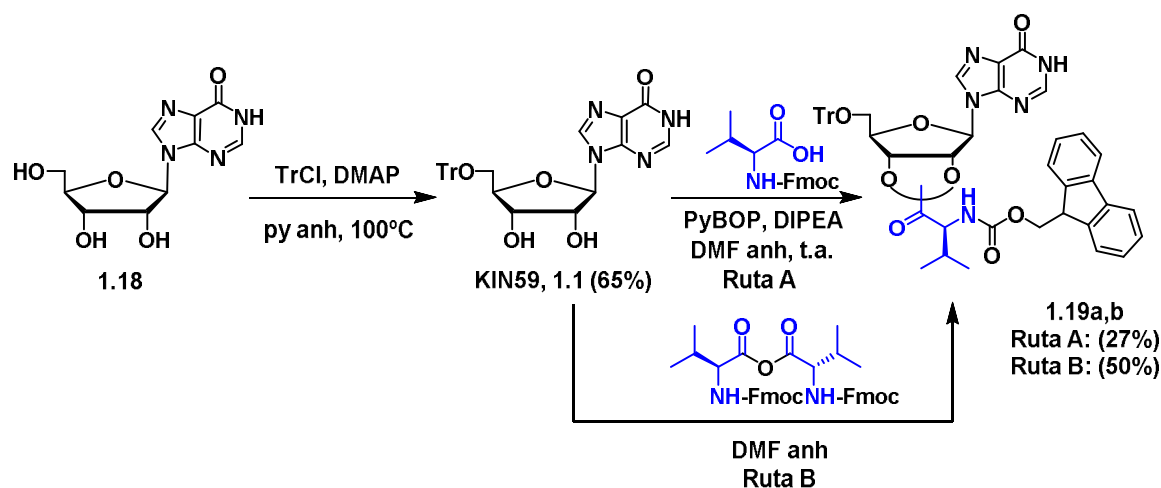
En el esquema 1.2 se reflejan las estructuras tripeptídicas propuestas y la ruta de síntesis elegida a partir de la 5'-O-tritilinosina (**KIN59**, **1.1**). Ésta ha consistido en la preparación del éster de valina (**1.8a,b**) y posterior acoplamiento con los correspondientes dipéptidos convenientemente protegidos para obtener los derivados tripeptídicos de Val-Pro-Val (**1.9a,b**), Lys-Pro-Val (**1.10a,b**) y Asn-Pro-Val (**1.11a,b**). Con esta ruta de síntesis se obtendrá la mezcla de productos acilados en las posiciones 2' y 3', pero se descartó la separación de los dos regioisómeros ya que es conocido que los grupos acilos pueden migrar entre grupos hidroxilo en medio acuoso,<sup>41,42</sup> medio donde se van a ensayar los productos. Además la ruptura final del enlace éster en cualquiera de ellos liberará el **KIN59**.

Como grupo protector del extremo *N*-terminal de los dipéptidos y del grupo amino de la valina, se ha elegido el grupo Fmoc que se elimina en medios básicos, ortogonal al grupo tritilo de la posición 5' del nucleósido, sensible a condiciones ácidas. Previo a la síntesis de los profármacos propuestos, se prepararon los dipéptidos Fmoc-Val-Pro-OH (**1.13**), Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**1.15**) y Fmoc-Asn-Pro-OH (**1.17**), siguiendo un procedimiento descrito para la síntesis de péptidos en disolución empleando una estrategia Fmoc/*t*Bu como se muestra en el esquema 1.3.<sup>32</sup> El acoplamiento de Fmoc-Val-OH o Fmoc-Lys(Fmoc)-OH o Fmoc-Asn-OH con H-Pro-O<sup>*t*</sup>Bu se realizó con PyBOP en diclorometano en presencia de TEA, seguido de la desprotección del grupo *terc*-butilo por tratamiento con TFA en diclorometano.



**Esquema 1.3.** Síntesis de dipéptidos: Fmoc-Val-Pro-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH y Fmoc-Asn-Pro-OH

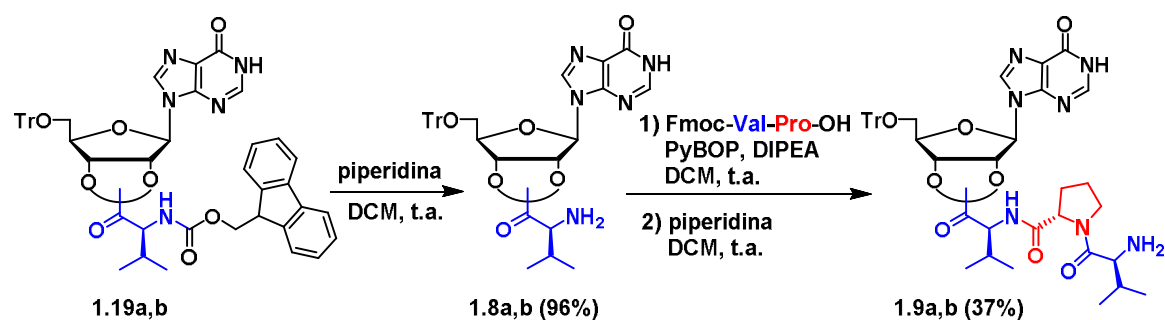
Para la obtención de **KIN59**, se hizo reaccionar la inosina (**1.18**) con cloruro de tritilo, en presencia de DMAP, en piridina anhidra a 100 °C en un tubo de presión durante 2 horas, obteniéndose con un 65% de rendimiento (Esquema 1.4). En trabajos previos realizados por nuestro grupo para la síntesis de ésteres de aminoácidos en nucleósidos portadores de grupos tritilo en la posición 5',<sup>43</sup> se había empleado PyBOP como agente de acoplamiento. Por lo tanto, se hizo reaccionar **KIN59** con Fmoc-Val-OH empleando PyBOP y DIPEA en DMF a temperatura ambiente, obteniéndose el éster **1.19a,b** con un 27% de rendimiento (Esquema 1.4, Ruta A).



**Esquema 1.4.** Síntesis de los conjugados de valina protegidos

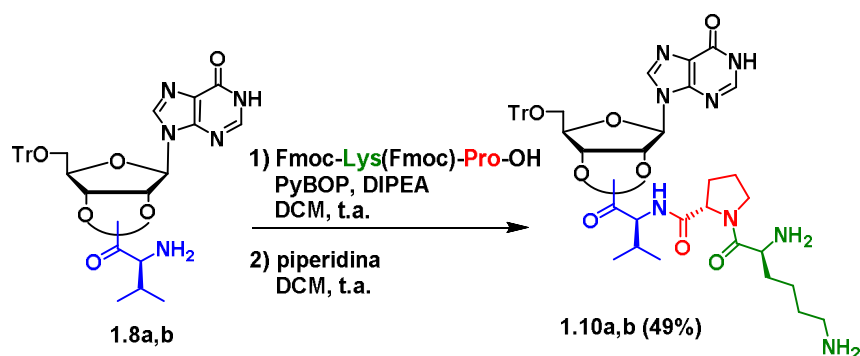
Para mejorar este bajo rendimiento se ensayaron otros agentes de acoplamiento (DCC y HATU), así como diferentes bases (TEA, DIPEA) y temperaturas (0 °C, 30 °C y 50 °C) pero los rendimientos del acoplamiento seguían siendo bajos. Por el contrario, cuando se hizo reaccionar **KIN59** con el anhídrido de valina, sintetizado a partir de Fmoc-Val-OH con DIC en diclorometano anhidro a 0 °C se obtuvieron los productos de acoplamiento **1.19a,b** con un 50% de rendimiento (Esquema 1.4, Ruta B). Los productos de acoplamiento son una mezcla de los dos regioisómeros acilados en las posiciones 2' y 3' del azúcar. En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y gCOSY se observa la presencia de los dos compuestos, siendo mayoritario el producto acilado en posición 3' ya que el H-3' del producto mayoritario está más desapantallado ( $\delta = 5.34$  ppm) que el H-3' del producto minoritario ( $\delta = 4.68$  ppm).

La desprotección del grupo Fmoc de **1.19a,b** con piperidina en diclorometano dio lugar a **1.8a,b** con un 96% de rendimiento (Esquema 1.5). Posteriormente, la reacción de **1.8a,b** con Fmoc-Val-Pro-OH utilizando PyBOP como agente de acoplamiento, en presencia de DIPEA en diclorometano condujo a la mezcla de conjugados tripeptídicos protegidos, que tras tratamiento con piperidina en diclorometano dio lugar a los derivados de Val-Pro-Val (**1.9a,b**) con un 37% de rendimiento para los dos pasos.



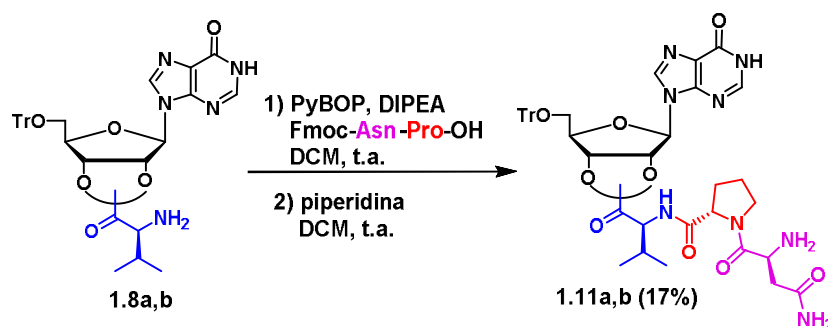
**Esquema 1.5.** Síntesis de los conjugados tripeptídicos Val-Pro-Val

De un modo similar, se llevó a cabo la síntesis de los conjugados tripeptídicos de Lys-Pro-Val (Esquema 1.6) mediante reacción de **1.8a,b** con Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH, empleando PyBOP y DIPEA en diclorometano a temperatura ambiente. Posteriormente, se desprotegieron los grupos Fmoc con piperidina en diclorometano, obteniéndose **1.10a,b** con un 49% de rendimiento para los dos pasos.



**Esquema 1.6.** Síntesis de los conjugados tripeptídicos Lys-Pro-Val

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de los conjugados tripeptídicos de Asn-Pro-Val (Esquema 1.7) mediante reacción de **1.8a,b** con Fmoc-Asn-Pro-OH, empleando PyBOP y DIPEA en diclorometano a temperatura ambiente. Después se desprotegió el grupo Fmoc con piperidina en diclorometano para obtener los derivados tripeptídicos **1.11a,b** con un 17% de rendimiento para los dos pasos.



**Esquema 1.7.** Síntesis de los conjugados tripeptídicos Asn-Pro-Val

La caracterización de estos compuestos tripeptídicos se hizo a través de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , mono y bidimensionales (gCOSY, gHMBC y gHSQC).

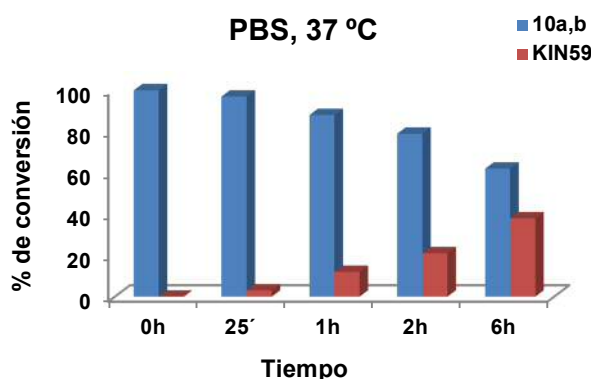
Una vez obtenidos los derivados tripeptídicos, se realizaron los estudios de solubilidad de los profármacos **1.9a,b**, **1.10a,b** y **1.11a,b**. Para ello se suspendió un exceso del compuesto patrón (**KIN59**) y de los profármacos (**1.9a,b**, **1.10a,b** y **1.11a,b**) a ensayar en PBS y se agitaron durante 2 horas. Posteriormente, las muestras se filtraron y la cantidad disuelta se cuantificó por HPLC interpolando los datos obtenidos en rectas patrón previamente elaboradas a partir de concentraciones conocidas para cada compuesto. Los resultados obtenidos para los conjugados tripeptídicos y para el **KIN59** se recogen en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Determinación de la solubilidad en tampón fosfato (PBS)

Compuestos	Solubilidad en PBS (mg/ml)	Incremento de solubilidad
<b>KIN59</b>	0.005	-
<b>1.9a,b = [Val-Pro-Val]-[KIN59]</b>	0.030	6
<b>1.10a,b = [Lys-Pro-Val]-[KIN59]</b>	1.290	258
<b>1.11a,b = [Asn-Pro-Val]-[KIN59]</b>	0.080	16

Como se puede observar la solubilidad acuosa del **KIN59** es realmente baja (0.005 mg/ml). El profármaco **1.9a,b**, de secuencia Val-Pro-Val presentó un incremento de solubilidad de 6 veces con respecto al fármaco patrón (**KIN59**), mientras que el profármaco de secuencia Asn-Pro-Val (**1.11a,b**) supuso un incremento de 16 veces. Por su parte, el profármaco de secuencia Lys-Pro-Val (**1.10a,b**) mostró un resultado espectacular, ya que resultó ser 258 veces más soluble que **KIN59**.

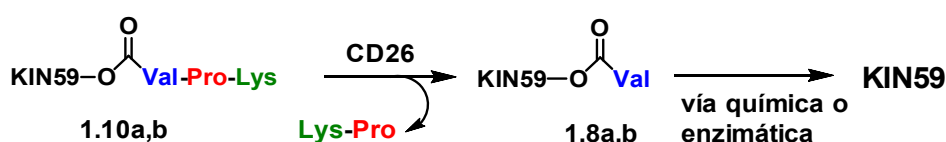
Los estudios de estabilidad química y enzimática se hicieron solamente para los derivados tripeptídicos **1.10a,b** y **1.11a,b**, que eran los profármacos que habían mostrado mejor solubilidad. Para llevar a cabo la estabilidad química, la mezcla de regioisómeros **1.10a,b** en PBS incubada a 37 °C se analizó por HPLC tomando alícuotas a determinados tiempos (0h, 25', 1 h, 2 h y 6 h). Los resultados obtenidos se recogen en la figura 1.9 donde las barras azules del gráfico representan el % de profármaco **1.10a,b** intacto.



**Figura 1.9.** Estudios de estabilidad de **1.10a,b** en PBS a 37 °C

En este gráfico se puede ver como el profármaco de secuencia Lys-Pro-Val (**1.10a,b**) no es completamente estable en PBS, ya que el enlace éster se hidroliza aproximadamente un 40% tras 6 horas de incubación a 37 °C.

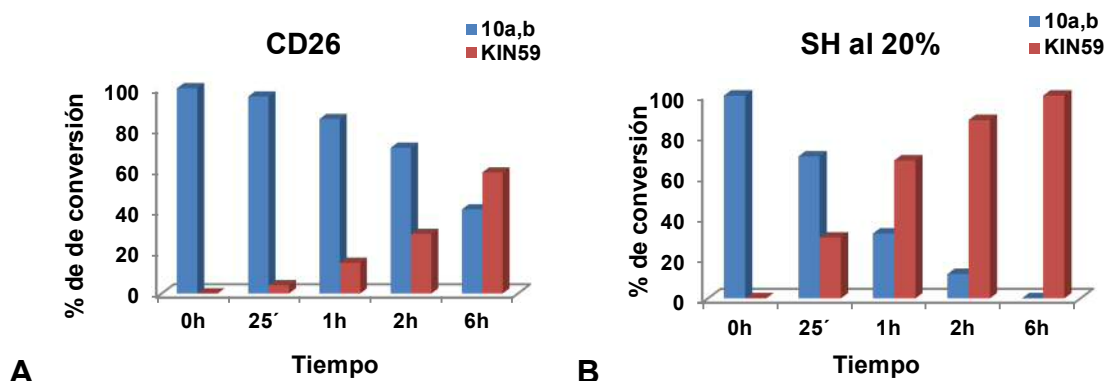
En paralelo, se llevaron a cabo los estudios de estabilidad enzimática. El mecanismo de liberación que cabría esperar para el **KIN59** a partir de este profármaco (**1.10a,b**) es el que se recoge en el esquema 1.8, donde la enzima CD26 reconocería el enlace amida de la unidad de prolina liberando el dipéptido terminal Lys-Pro, seguido de la hidrólisis del éster de valina por vía química o enzimática.



**Esquema 1.8.** Mecanismo de liberación propuesto para el **KIN59** a partir del profármaco **1.10a,b**

En la figura 1.10.A se representan los datos obtenidos del profármaco (**1.10a,b**) incubado en presencia de la enzima CD26, mientras que la figura 1.10.B recoge los resultados de este compuesto incubado en suero humano al 20%, recordando que el suero contiene CD26. Los estudios de reconocimiento por CD26 y de estabilidad en suero han sido realizados por el equipo del Prof. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica), conforme a procedimientos descritos.<sup>31,38</sup>

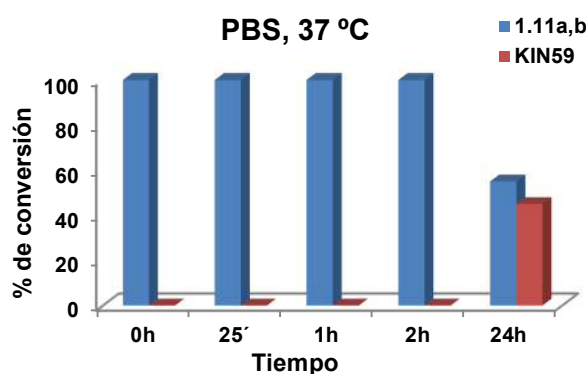




**Figura 1.10.** Estudios de estabilidad del profármaco **1.10a,b** en presencia de la enzima CD26 purificada (A) y de suero humano al 20% (B) tras 6 horas de incubación a 37 °C

En ambos casos se observa la liberación del **KIN59**, especialmente notable cuando la incubación se realiza en suero humano donde a las 6 horas la conversión es total. Cabe mencionar que en estos ensayos no se observó la formación del derivado de valina **1.8a,b**.

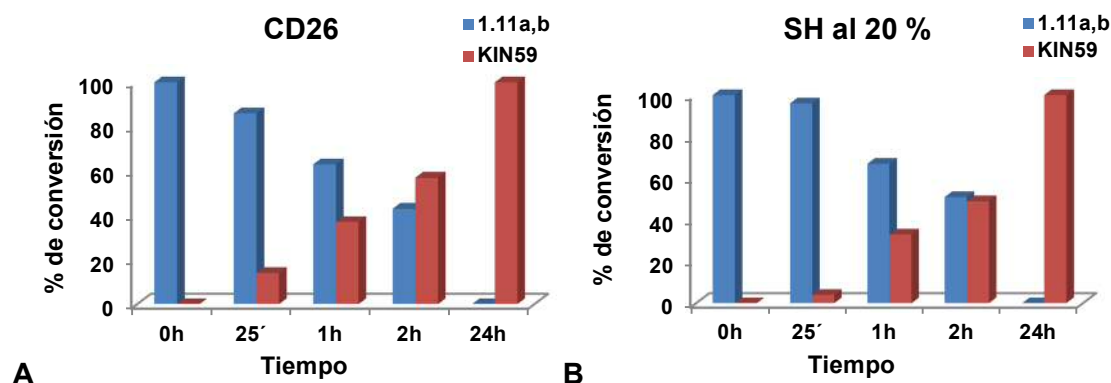
Sobre los regioisómeros **1.11a,b** de secuencia Asn-Pro-Val también se llevaron a cabo los estudios de estabilidad química así como la incubación con la enzima CD26 purificada y en suero humano al 20%. En la figura 1.11 se muestra el resultado obtenido al incubar **1.11a,b** en PBS a 37 °C, donde el porcentaje de profármaco intacto se muestra en azul mientras que las barras rojas indican el **KIN59** liberado.



**Figura 1.11.** Estudios de estabilidad de **1.11a,b** en PBS a 37 °C

Se puede observar como en PBS la mezcla de regioisómeros **1.11a,b**, de secuencia Asn-Pro-Val es perfectamente estable tras dos horas de incubación mientras que tras 24 horas de incubación se hidroliza casi el 50% del profármaco. Por tanto con esta secuencia se consigue una mejora notable de la estabilidad química respecto a los compuestos de secuencia Lys-Pro-Val analizados anteriormente. Por su parte los

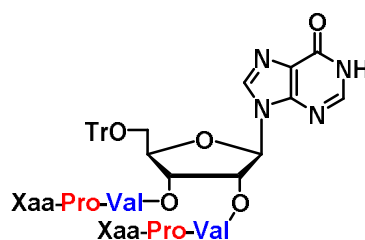
estudios de incubación en presencia de CD26 de **1.11a,b** (Figura 1.12.A) así como los estudios de incubación en suero humano al 20% (Figura 1.12.B) muestran la conversión del **1.11a,b** al **KIN59** de modo que tras 24 horas de incubación se ha liberado completamente el **KIN59**. Además, como en los casos anteriores, no se ha observado el conjugado de valina **1.8a,b**.



**Figura 1.12.** Estudios de estabilidad de **1.11a,b** en presencia de la enzima CD26 purificada (A) y de suero humano al 20% (B) tras 24 horas de incubación a 37 °C

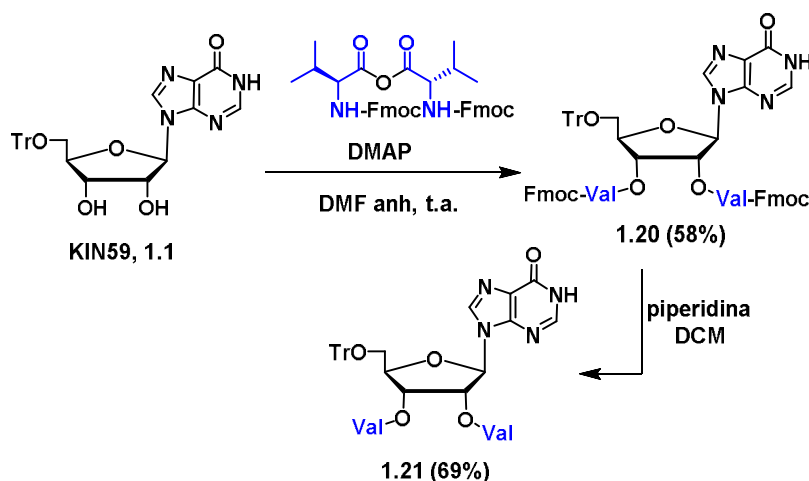
Los resultados de solubilidad y estabilidad de los profármacos **1.10a,b** y **1.11a,b** han puesto de manifiesto que la incorporación de la secuencia Lys-Pro-Val (**1.10a,b**) permite una mejora notable de la solubilidad respecto al **KIN59**, pero que la estabilidad química de estos derivados tripeptídicos es baja como se ha puesto de manifiesto en la incubación en PBS a 37 °C. Por su parte, los profármacos de secuencia Asn-Pro-Val (**1.11a,b**) presentan una estabilidad química adecuada aunque una moderada solubilidad. En ambos casos, la liberación del **KIN59** en las condiciones ensayadas es total.

Por lo tanto, era aconsejable ensayar otra aproximación. Para ello, se planteó la síntesis de conjugados tripeptídicos esterificados en las posiciones 2' y 3' de la ribosa (Figura 1.13). Con ello, se pretende aumentar la estabilidad respecto a los compuestos monoesterificados en 2' o 3'. El hecho de que no haya un grupo hidroxilo libre contiguo al grupo éster que une el tripeptido al nucleósido podría impedir o dificultar la migración de este grupo éster en medio acuoso mejorándose de este modo la estabilidad del profármaco. Además, el **KIN59** debería ser liberado del mismo modo, por vía química y/o enzimática (CD26, esterasas). Además era previsible un aumento de la solubilidad acuosa ya que cada unidad tripeptídica incorporada podría contribuir al incremento de solubilidad.



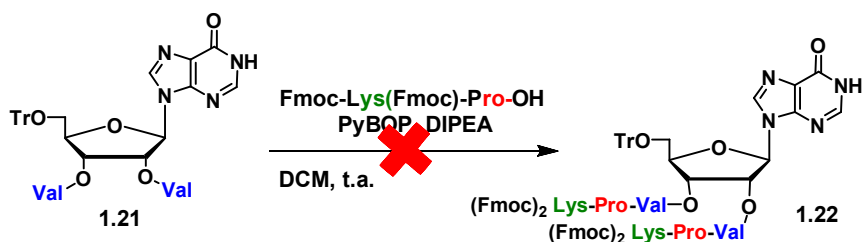
**Figura 1.13.** Estructura de los conjugados tripeptidos esterificados en las posiciones 2' y 3' del azúcar

Como nexo de unión (Figura 1.13) se mantendría la Val, mientras que como dipéptido terminal (Pro-Xaa) se eligió la secuencia Lys-Pro, puesto que esta secuencia era la que mostraba una mejor solubilidad para el caso de los monoesterificados en 2' o 3'. Para la síntesis se consideró una estrategia análoga a la seguida para los productos monoesterificados. Así, se hizo reaccionar el **KIN59** con el anhídrido de valina (2.5 eq) en DMF y en presencia de DMAP a temperatura ambiente dando lugar al conjugado esterificado en las posiciones 2' y 3' de la ribosa (**1.20**) con un 58% de rendimiento. (Esquema 1.9) La desprotección del grupo Fmoc de este compuesto con piperidina dio lugar al conjugado **1.21** con un 69% de rendimiento.



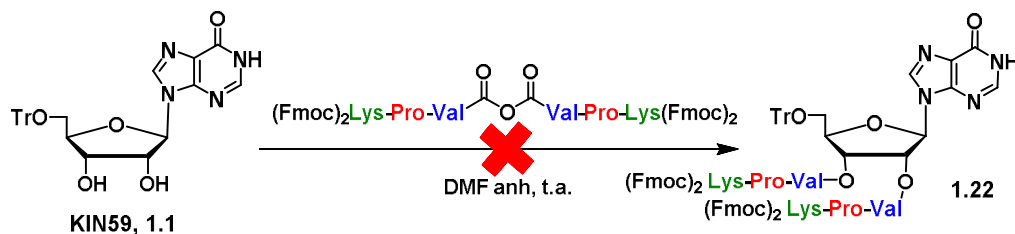
**Esquema 1.9.** Síntesis del conjugado de valina en las posiciones 2' y 3' de la ribosa

Posteriormente, se hizo reaccionar **1.21** con el dipéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (Esquema 1.10), en presencia de DIPEA, y utilizando PyBOP como agente de acoplamiento en DCM a temperatura ambiente pero tras 24 horas no se observó por HPLC-MS el producto deseado (**1.22**).



**Esquema 1.10.** Síntesis del conjugado Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val esterificado en las posiciones 2' y 3' del azúcar

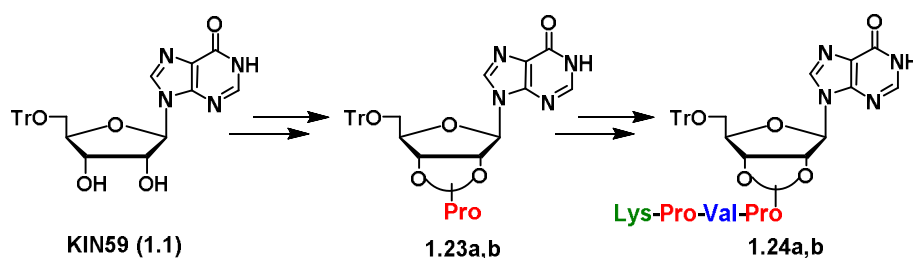
Se ensayaron diferentes agentes de acoplamiento como PyBrOP, HCTU y HATU, así como variaciones en la presión (tubo sellado) y en la temperatura (temperatura ambiente, 40 °C y 60 °C) pero con ninguna de estas modificaciones se obtuvo el compuesto deseado. Los cromatogramas de HPLC-MS solo mostraban la incorporación parcial de un dipéptido en una de las valinas, y cuando se aplicaban condiciones más energéticas, se producía la desprotección del grupo Fmoc. Para poder emplear temperaturas más altas sin que saltara el grupo protector, se hizo reaccionar el anhídrido del tripéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH previamente formado con DIC en DMF anhidra a 0 °C con el **KIN59** en ausencia de base, y se calentó al microondas a 70 °C durante 30 min pero solo se observó el compuesto tripeptídico monoesterificado (**1.10a,b**) en 2' ó 3' del azúcar en vez del compuesto tripeptídico esterificado en 2' y 3' (**1.22**) (Esquema 1.11).



**Esquema 1.11.** Síntesis del conjugado Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val esterificado en las posiciones 2' y 3' del azúcar

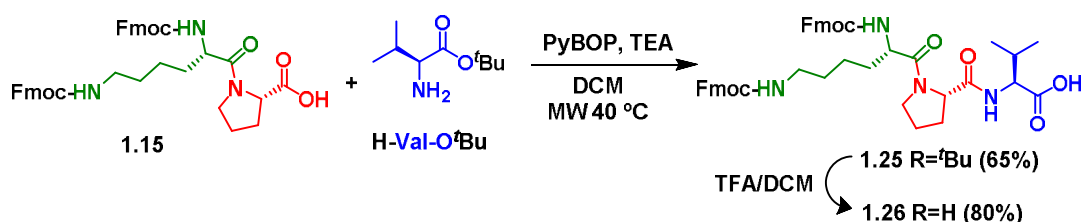
Viendo las dificultades encontradas para la obtención del profármaco doblemente sustituido con tripéptidos en las posiciones 2' y 3' del azúcar, reconsideramos los antecedentes de que disponíamos y centramos nuestra atención en la conjugación con un tetrapéptido. Según se comentó en los antecedentes, la liberación del fármaco en este caso se basa en el reconocimiento del dipéptido terminal por CD26 y posterior formación espontánea de la dicetopiperazina con el dipéptido más próximo al OH del nucleósido. La secuencia dipeptídica terminal elegida fue Lys-Pro ya que proporcionaba un incremento considerable en la solubilidad, mientras que como nexo de unión se

mantuvo el dipéptido Val-Pro que ya se había ensayado con anterioridad.<sup>40</sup> La utilización de la prolina para la formación del enlace éster con el nucleósido podría aumentar la estabilidad química y por tanto la estabilidad del enlace fármaco-transportador. Dadas las dificultades encontradas para sustituir simultáneamente las posiciones 2' y 3', se consideró obtener el producto monoesterificado. Para ello, se decidió emplear la misma estrategia de síntesis que para los conjugados tripeptídicos. De este modo se prepararía el éster de prolina (**1.23a,b**) que tras posterior acoplamiento con el tripéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH seguido de la desprotección de los grupos Fmoc daría lugar al profármaco deseado **1.24a,b** (Esquema 1.12).



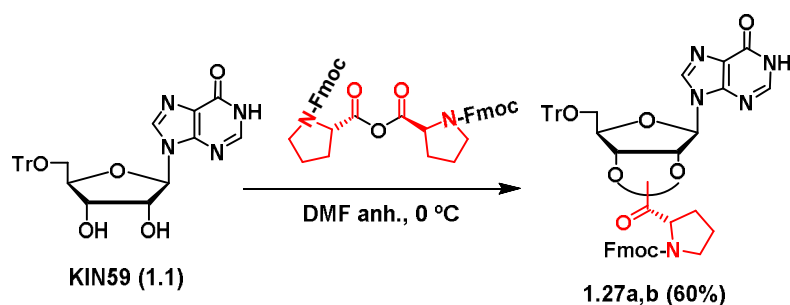
**Esquema 1.12.** Estrategia de síntesis de los conjugados tetrapeptídicos

Por lo tanto, fue necesario sintetizar el tripéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH empleándose la misma estrategia de protección Fmoc/<sup>t</sup>Bu que en los casos anteriores como se muestra en el esquema 1.13. El acoplamiento del dipéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**1.15**), sintetizado anteriormente, con H-Val-O<sup>t</sup>Bu se realizó con PyBOP en presencia de TEA en diclorometano, obteniéndose el compuesto **1.25** con un 65% de rendimiento. A continuación, se desprotegió el grupo *tert*-butilo mediante tratamiento con TFA en diclorometano resultando el tripéptido **1.26** con un 80% de rendimiento.



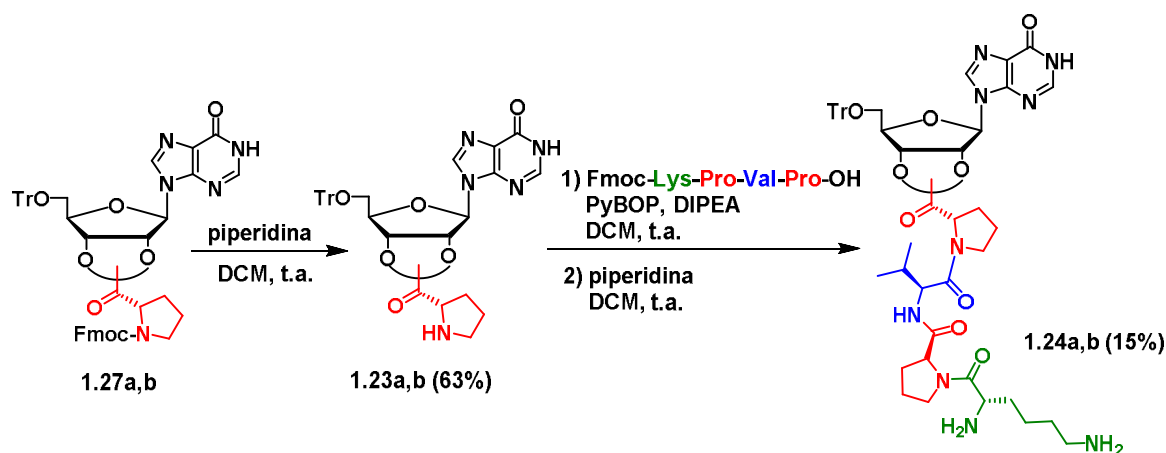
**Esquema 1.13.** Síntesis del tripéptido Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH

Para la obtención del éster de prolina se trató la 5'-O-tritilinosina (**1.1**) con el anhídrido de prolina, sintetizado a partir de Fmoc-Pro-OH con DIC en DMF anhidra a 0 °C obteniéndose los productos de acoplamiento **1.27a,b** con un 60% de rendimiento (Esquema 1.14).



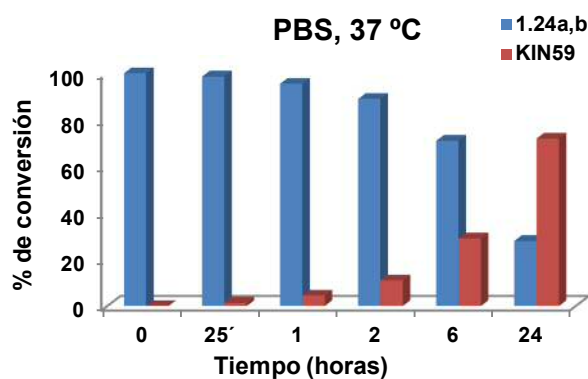
**Esquema 1.14.** Síntesis de los conjugados de prolina protegidos en 2'ó 3' del azúcar

La desprotección del grupo Fmoc de **1.27a,b** con piperidina en diclorometano dio lugar a **1.23a,b** con un 63% de rendimiento (Esquema 1.15). A continuación, la reacción de **1.23a,b** con Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH utilizando PyBOP como agente de acoplamiento, en presencia de DIPEA en diclorometano condujo a la mezcla de conjugados tetrapeptídicos protegidos, que tras tratamiento con piperidina en diclorometano dio lugar a los derivados de Lys-Pro-Val-Pro (**1.24a,b**) con un 15% de rendimiento para los dos pasos.



**Esquema 1.15.** Síntesis de los conjugados tetrapeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val-Pro en 2'ó 3' del azúcar

A continuación se llevaron a cabo los estudios de estabilidad y solubilidad para la mezcla de regioisómeros **1.24a,b**. Los resultados de los estudios de estabilidad química se muestran en la figura 1.14. La incubación de la mezcla de regioisómeros **1.24a,b** de secuencia Lys-Pro-Val-Pro en PBS indicó que esta mezcla es bastante estable, liberando aproximadamente un 30% del **KIN59** tras seis horas de incubación y un 70% tras 24 horas de incubación. Por tanto con esta secuencia se consigue una mejora moderada de la estabilidad química respecto a los conjugados tripeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val (**1.10a,b**) preparados anteriormente.



**Figura 1.14.** Estudios de estabilidad de los conjugados tetrapeptídicos **1.24a,b** en PBS a 37 °C

Los estudios de solubilidad en PBS de los conjugados de secuencia Lys-Pro-Val-Pro (**1.24a,b**) se realizaron de un modo similar al de los profármacos anteriores. Estos conjugados mostraron un incremento de solubilidad mayor de 2000 veces respecto al **KIN59**, muy superior a la de los profármacos tripeptídicos **1.10a,b** de secuencia Lys-Pro-Val (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Determinación de la solubilidad en tampón fosfato (PBS)

Compuestos	Solubilidad en PBS (mg/ml)	Incremento de solubilidad
<b>KIN59</b>	0.005	-
<b>1.10a,b = [Lys-Pro-Val]-[KIN59]</b>	1.290	258
<b>1.24a,b = [Lys-Pro-Val-Pro]-[KIN59]</b>	10.000	2000

Por lo tanto, con esta aproximación se ha conseguido una mejora moderada de la estabilidad química respecto a los profármacos tripeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val y un incremento espectacular de la solubilidad. Con el fin de mejorar la estabilidad química, se pretende iniciar en breve la síntesis de los derivados tetrapeptídicos de secuencia Asn-Pro-Val-Pro, avalados por los resultados obtenidos con los derivados tripeptídicos.

En paralelo se abordó otra alternativa interesante para obtener profármacos del **KIN59** que consistió en buscar un punto de anclaje para el transportador distinto de las posiciones 2' o 3' del azúcar. Puesto que el grupo tritilo es clave para la actividad antiangiogénica,<sup>23</sup> se analizaron las modificaciones que habían sido realizadas previamente en la base del nucleósido y que no suponían pérdida significativa de la actividad. Dentro de estas modificaciones resultaba interesante la actividad del

compuesto **1.28** (Figura 1.15) con un grupo 2-metoxietoximetilo en el N-1 de la base, que mostraba actividad antiangiogénica similar al **KIN59** en el ensayo CAM.<sup>44</sup>

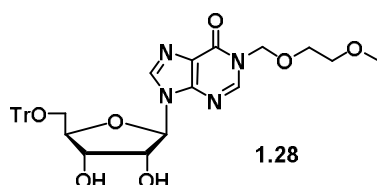


Figura 1.15

A partir de la estructura de este compuesto (**1.28**) se planteó la síntesis de un compuesto análogo con un grupo amino terminal que permitiera la incorporación de péptidos. Así, se propuso la síntesis del derivado de glicol **1.29** (Figura 1.16) a partir del cual sería posible la síntesis de los correspondientes profármacos de fórmula general **A**. En este caso, y conforme a lo comentado en los antecedentes, la secuencia a incorporar sería un dipéptido (Xaa-Pro) teniendo en cuenta que la unión se realizaría a través de un grupo amino.

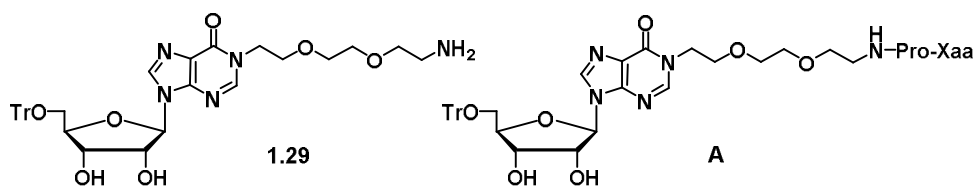
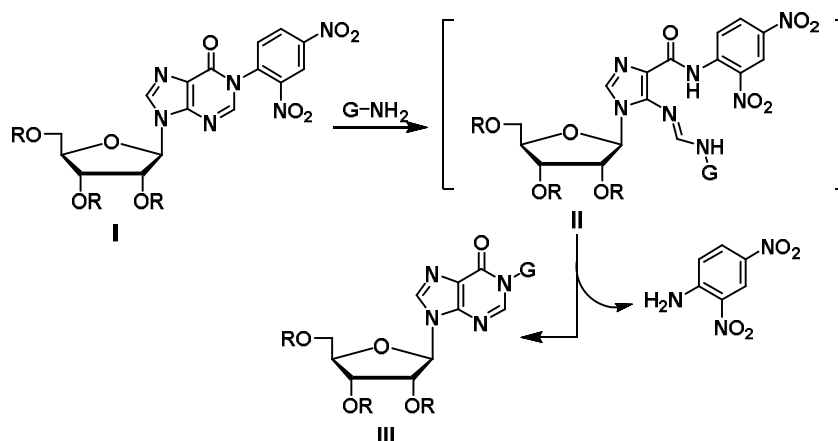


Figura 1.16

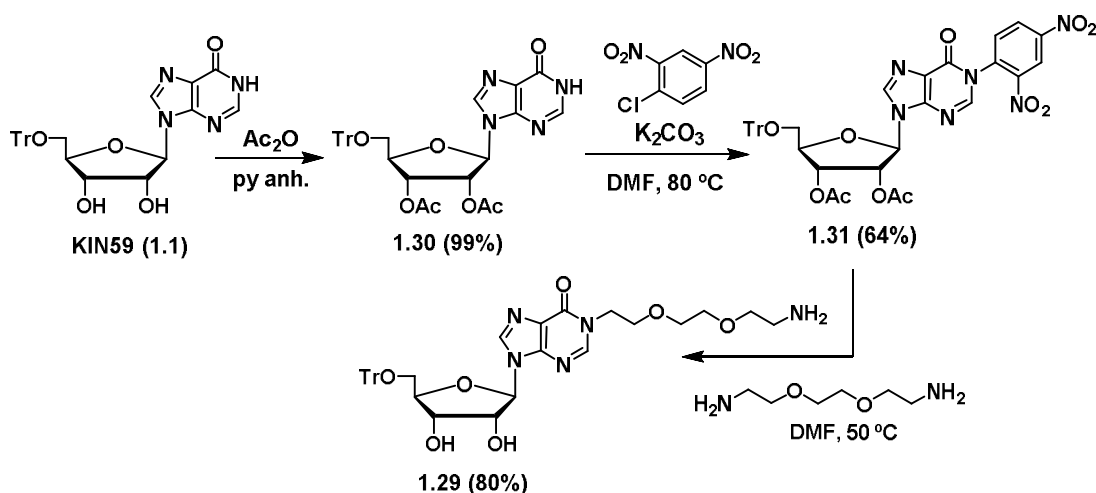
Para la incorporación de sustituyentes con una amina terminal en la posición 1 de derivados de inosina la vía más utilizada es la descrita por De Napoli y col. que consiste en la activación de la posición C-2 al introducir el grupo 2,4-dinitrobenceno en el N-1 de la base (Esquema 1.16).<sup>45</sup> Así el tratamiento del nucleósido N-1 arilado (I) con aminas conduce a la apertura del anillo de pirimidina por el ataque nucleófilo sobre el C-2 formándose una formamidina (II) que por reacción de cierre de ciclo libera la 2,4-dinitroanilina quedando la amina en la posición N-1 (III).





**Esquema 1.16.** Funcionalización de inosinas en N-1 descrita por De Napoli<sup>45</sup>

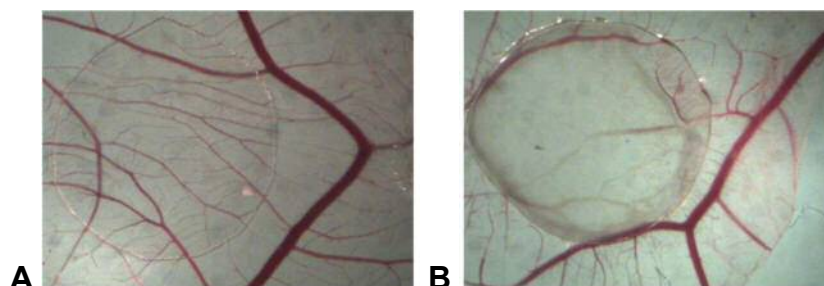
Así, el **KIN59** (**1.1**) se trató con anhídrido acético en piridina anhidra para proteger los grupos hidroxilos 2' y 3' del azúcar obteniéndose el compuesto **1.30** de forma cuantitativa.<sup>46</sup> Después, se hizo reaccionar **1.30** con 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno, en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en DMF a 80 °C, obteniéndose el compuesto **1.31** con un 64% de rendimiento (Esquema 1.17).<sup>47</sup> El compuesto **1.31** se trató con la 2-[2-(2-aminoetoxi)eto]etilamina en DMF a 50 °C, obteniéndose el producto **1.29** con un 80% de rendimiento. En este último paso, además de producirse la sustitución nucleófila, también se dio la desprotección de los grupos acetilos de las posiciones 2' y 3' del azúcar.



**Esquema 1.17.** Síntesis del compuesto **1.29**

Antes de proceder a la síntesis de los profármacos, era importante estudiar la actividad antiangiogénica de este nuevo compuesto, ya que la acción del CD26 sobre los profármacos de fórmula general **A** (Figura 1.16) liberará el compuesto **1.29** y no el **KIN59** como con los ésteres en 2' o/y 3' descritos en los apartados previos. Así, se

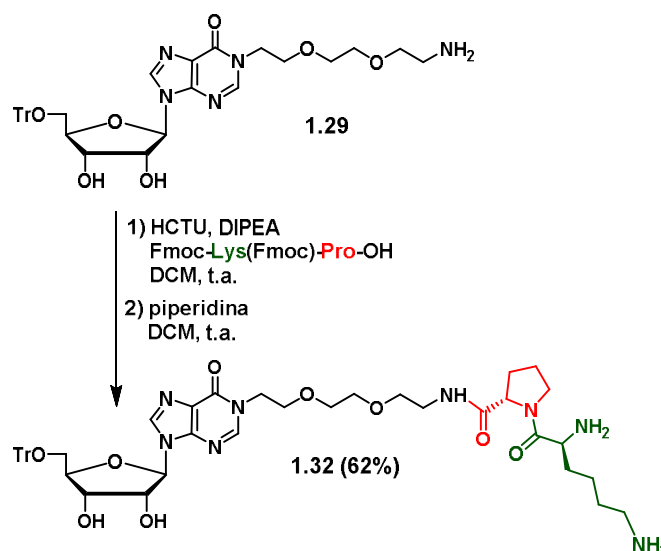
evaluó la actividad antiangiogénica de **1.29** en el ensayo CAM. Tal y como se había hecho previamente con el **KIN59**, se estimuló la neovascularización añadiendo a la membrana timidina fosforilasa como agente proangiogénico. A una concentración de 150 nmol/membrana, el efecto de **1.29** fue algo más marcado que con el **KIN59** creándose una zona avascular en todos los huevos ensayados (6 sobre 6) frente a los 5 sobre 7 en el caso del **KIN59**. En la figura 1.17 se muestra una imagen de un experimento control (Figura 1.17.A) y el efecto del compuesto **1.29** a la concentración indicada (Figura 1.17.B).



**Figura 1.17.** Efecto de **1.29** (**B**) sobre la angiogénesis inducida por TF en el ensayo CAM frente a un experimento control (**A**)

Por tanto, la actividad de **1.29** en este ensayo era similar a la del **KIN59** y esto avalaba su utilización como un sustituto del **KIN59** para su conjugación con dipéptidos.

Basados en los precedentes del grupo para la síntesis de profármacos a partir de compuestos con grupos amino alquílicos primarios, un dipéptido puede ser una unidad suficiente para dar estabilidad y solubilidad al profármaco.<sup>32,36</sup> De las secuencias Xaa-Pro posibles, se consideró que el dipéptido de secuencia Lys-Pro era el que podía aportar una mayor solubilidad. Por tanto, se hizo reaccionar el nucleósido **1.29** con Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH, DIPEA y HCTU como agente de acoplamiento en DCM a temperatura ambiente. Cabe destacar que se obtuvo de forma selectiva el producto de acoplamiento entre el ácido del dipéptido y la amina primaria (Esquema 1.18). Posteriormente, se desprotegió el grupo protector Fmoc con piperidina en diclorometano, obteniéndose **1.32** con un 62% de rendimiento para los dos pasos.



Esquema 1.18. Síntesis del profármaco 1.32

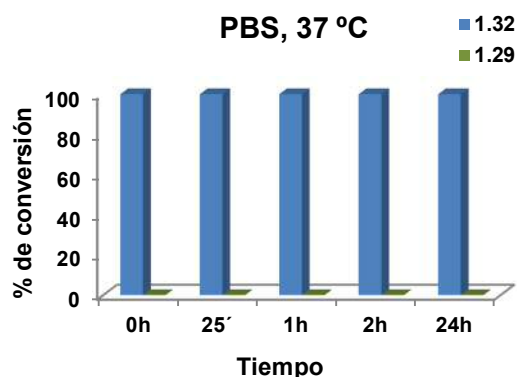
Para este profármaco **1.32** así como para su compuesto padre **1.29** se determinó la solubilidad en PBS siguiendo un procedimiento análogo al descrito en los apartados anteriores. Los resultados obtenidos se incluyen en la tabla 1.3 donde también se recoge la solubilidad del **KIN59** a efectos comparativos.

Tabla 1.3. Determinación de la solubilidad en tampón fosfato (PBS)

Compuestos	Solubilidad en PBS (mg/ml)	Incremento de solubilidad
<b>KIN59</b>	0.005	-
<b>1.29</b>	0.220	44
<b>1.32 = [Lys-Pro]-[1.29]</b>	0.880	177

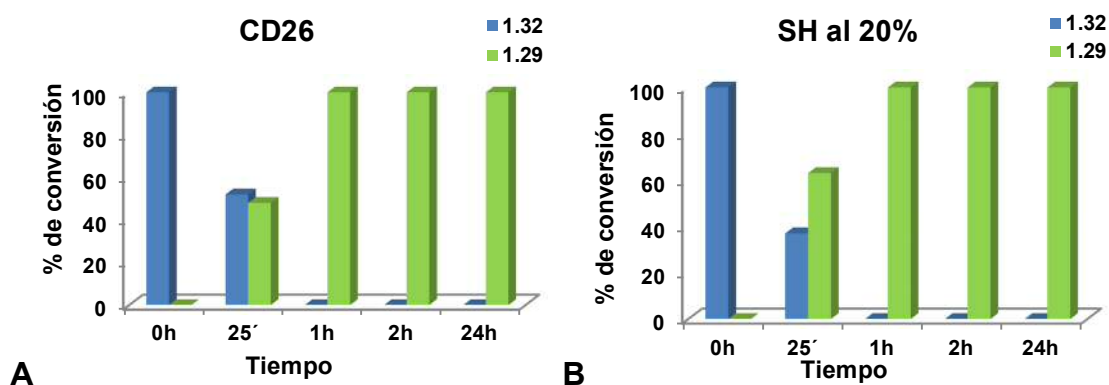
El primer dato a destacar es que el derivado de glicol **1.29** presenta una solubilidad de 0.22 mg/ml, 44 veces superior a la del **KIN59**. La incorporación de la secuencia Lys-Pro sobre el grupo amino de este compuesto, es decir, el profármaco **1.32**, incrementa la solubilidad 4 veces más de modo que con esta doble modificación se consigue un compuesto 177 veces más soluble que el **KIN59**.

Se realizó el estudio de estabilidad química incubando el profármaco **1.32** en PBS a 37 °C. En la figura 1.18 se recogen los datos obtenidos, donde en azul se representa el profármaco **1.32**. Como se puede observar este profármaco presenta una perfecta estabilidad química tras 24 horas de incubación, sin que se detecte la formación del amino derivado **1.29** que se representaría en verde.



**Figura 1.18.** Estudios de estabilidad del profármaco **1.32** en PBS a 37 °C

Además, se realizaron los estudios de estabilidad enzimática incubando este profármaco (**1.32**) en presencia de la enzima CD26 (Figura 1.19.A) y también con suero humano al 20% (Figura 1.19.B). En estas gráficas se representa en azul el profármaco **1.32** y en verde el derivado de glicol, el compuesto **1.29**.



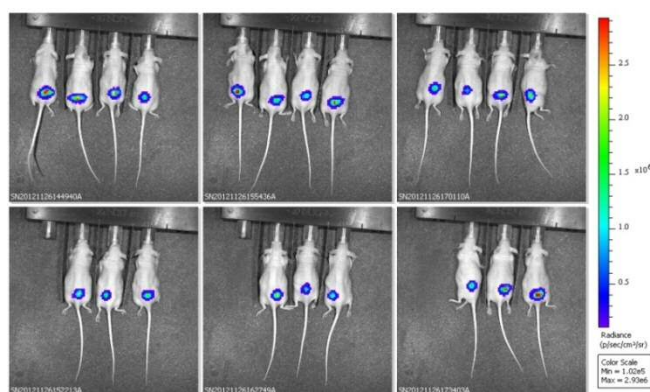
**Figura 1.19.** Estudios de estabilidad de **1.32** en presencia de la enzima CD26 purificada (A) y de suero humano al 20% (B) tras 24 horas de incubación a 37 °C

Así, en la incubación con CD26 (Figura 1.19.A), se observa la rápida conversión del profármaco (**1.32**) al compuesto **1.29** de modo que a los 25 min ya se ha liberado alrededor del 50% del compuesto patrón (**1.29**), y la conversión es total tras 1 hora de incubación. Esta conversión también se observa en la incubación con suero humano (Figura 1.19.B). En este caso a los 25 min queda menos de un 40% del profármaco intacto (**1.32**).

### Ensayos “in vivo”

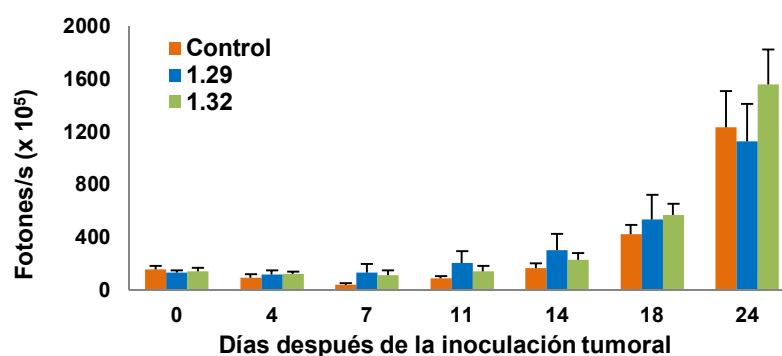
Avalados por estos datos, se retomó el objetivo principal de este capítulo que consistía en tener análogos del **KIN59** más solubles para su evaluación en ensayos “in

vivo". El modelo elegido fue un ensayo en ratones atímicos *nu/nu* donde se desarrolló un tumor subcutáneo con células luciferasa-positivas. Los compuestos a ensayar **1.29** y **1.32** se aplicaron por vía subcutánea en un sitio distinto al de inoculación del tumor. El crecimiento del tumor se siguió mediante toma de imágenes bioluminiscentes y medida del volumen del tumor. En la figura 1.20 se representa la imagen de estos ratones.



**Figura 1.20.** Ensayo “*in vivo*” en ratones atímicos *nu/nu*

Una vez terminado el experimento también se determinó el peso del tumor. Todos los parámetros se determinaron en comparación con un grupo control al que se administró sólo vehículo. Como se puede observar en la figura 1.21, tras 24 días de tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre los fotones de los grupos de ratones tratados con los compuestos **1.29**, **1.32** y el grupo control.



**Figura 1.20**

Teniendo en cuenta la actividad multidiana de la 5'-O-tritiinosina (**KIN59**) como se ha comentado en la introducción, es posible que el perfil antiangiogénico de la 5'-O-tritilinosina y del compuesto **1.29** sea diferente y quizás por ello requieran de modelos

## *Resultados y discusión*

animales también diferentes. Esta posibilidad está siendo estudiada por nuestros colaboradores biológicos.

También es posible que la solubilidad alcanzada no haya permitido las concentraciones efectivas suficientes para ver el efecto “*in vivo*”. En este sentido la preparación de derivados tetrapeptídicos tanto sobre los OHs del **KIN59**, como sobre el grupo amino de **1.29** podrían contribuir significativamente al incremento de solubilidad.

## 4. CONCLUSIONES

Con el fin de mejorar la escasa solubilidad acuosa de la 5'-O-tritilinosina (**KIN59**), se han estudiado distintas aproximaciones para la preparación de profármacos mediante la conjugación del **KIN59** con oligopéptidos que puedan ser reconocidos por la enzima CD26 y de este modo liberar el compuesto activo.

Por un lado, se ha llevado a cabo la conjugación a través de los OHs de las posiciones 2' ó 3' del nucleósido. Así, y utilizando una valina como nexo de unión, se han preparado conjugados tripeptídicos de secuencia Val-Pro-Val, Lys-Pro-Val y Asn-Pro-Val. En una segunda aproximación, y empleando el dipéptido Val-Pro como nexo de unión, se han preparado los conjugados tetrapeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val-Pro. Los intermedios sintéticos clave para estas dos aproximaciones han sido los derivados de valina **1.8a,b** y los de prolina **1.23a,b**, que se han preparado a partir del anhídrido simétrico del aminoácido y posterior reacción con el nucleósido.

Sobre los profármacos obtenidos se han realizado estudios de solubilidad, estudios de estabilidad química en PBS y estudios de estabilidad enzimática frente a la enzima CD26 y en suero humano al 20%. Los resultados mostraron que el profármaco tetrapeptídico de secuencia Lys-Pro-Val-Pro **1.24a,b** (Figura 1.21) fue el que presentó una solubilidad mayor, siendo 2000 veces más soluble que el **KIN59**, mostrando además una mejora moderada de la estabilidad química frente a los conjugados tripeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val.

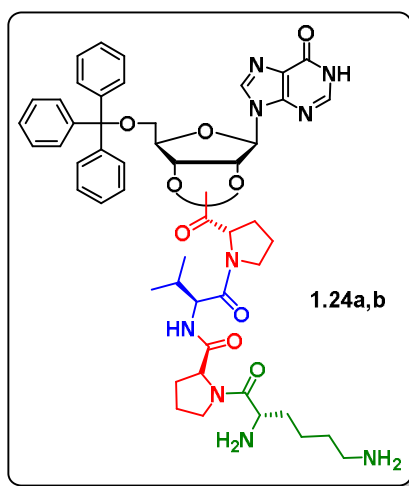


Figura 1.21

## Conclusiones

Una tercera aproximación se ha centrado en un compuesto análogo al **KIN59** portador de un grupo amino primario. El compuesto **1.29** (Figura 1.22), sintetizado en este capítulo, presenta actividad antiangiogénica en el ensayo CAM similar al **KIN59**. Además sobre el grupo amino de este compuesto se ha introducido la secuencia Lys-Pro y así se ha preparado el profármaco **1.32**. Este profármaco es perfectamente estable en PBS, libera el compuesto patrón (**1.29**) en presencia de la enzima CD26 en tiempos cortos y es 177 veces más soluble que el **KIN59**. Aunque los ensayos “*in vivo*” no han demostrado la actividad antitumoral deseada, el compuesto **1.29** abre la vía a nuevas modificaciones en esta familia de compuestos.

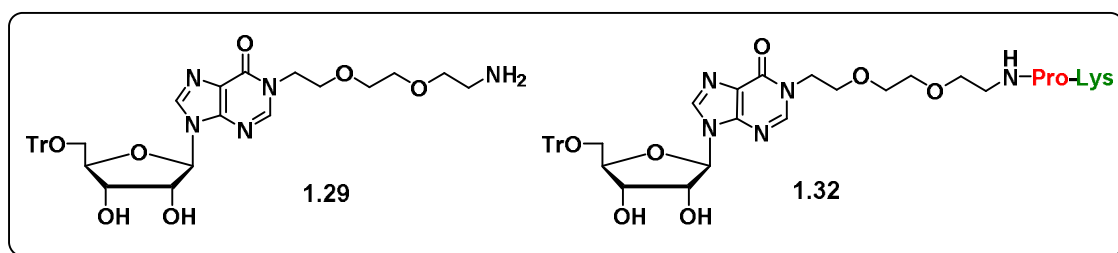


Figura 1.22



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Métodos generales

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F<sub>254</sub> (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm y se han visualizado con luz ultravioleta (254 nm), mediante pulverización con disolución de ninhidrina en etanol al 2% o con una disolución de ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. Este seguimiento también se ha llevado a cabo por HPLC-MS, empleando un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras. La piridina y la DMF anhidra se obtuvieron de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo Emrys<sup>TM</sup> Synthesizer (Biotage AB).

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por: a) cromatografía centrífuga circular en capa fina (CCTLC) en Cromatotrón<sup>®</sup> (gel de sílice 60 PF<sub>254</sub> con CaSO<sub>4</sub>) en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min respectivamente, b) cromatografía en cartucho SPE de gel de sílice y cromatografía flash (HPFC) en el Biotage Horizon.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 Hz), Varian UNITY-400 (a 400 y 100 Hz) y Varian 500 (a 500 y 125 Hz), respectivamente. Los espectros monodimensionales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en condiciones estándar. Se ha indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; hex, hextete; hept, heptete; dd, doble doblete; ddd, doble doblete; pt, pseudo- triplete; dt, doble triplete; m, multiplete), el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz) y la asignación estructural. Los espectros bidimensionales heteronucleares (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC y HMBC) utilizan la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono (30000 Hz), con un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-

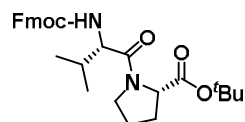
HSQC se procesan los datos en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros de masas se han registrado en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100, mediante las técnicas de Impacto Electrónico o Electro spray.

La pureza de los compuestos se ha medido por HPLC empleando dos métodos diferentes para cada compuesto en un aparato Waters 2690 Photodiode Array utilizando una columna de fase reversa Sunfire C-18, flujo 1 mL/min y como fase móvil: A: ACN con 0.04% de TFA y B:  $\text{H}_2\text{O}$  con 0.05% de TFA. Método 1: gradiente lineal A:B 10:90 a 100:0 en 5 minutos. Método 2: gradiente lineal A:B 30:70 a 70:30 en 5 minutos. Método 3: gradiente lineal A:B 10:90 a 95:5 en 5 minutos. Método 4: gradiente lineal A:B 20:80 a 80:20 en 10 minutos.

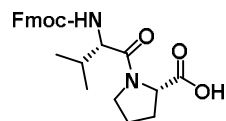
## 5.2. Síntesis de conjugados tripeptídicos del KIN59

### Fmoc-Val-Pro-O<sup>t</sup>Bu (1.12)



A una disolución de Fmoc-Val-OH (300 mg, 0.88 mmol) en diclorometano (9 mL) se añaden PyBOP (552 mg, 1.06 mmol), H-Pro-O<sup>t</sup>Bu.HCl (202 mg, 0.97 mmol) y TEA (184  $\mu\text{L}$ , 1.33 mmol). La mezcla se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con diclorometano (20 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (15 mL), una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (15 mL) y salmuera (15 mL), se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (40:1). Se obtienen 319 mg (73%) de **1.12** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

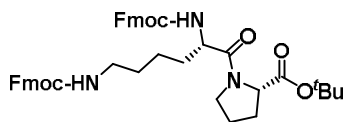
### Fmoc-Val-Pro-OH (1.13)



A una disolución de **1.12** (265 mg, 0.54 mmol) en diclorometano (2.7 mL) se añade TFA (824  $\mu\text{L}$ , 10.76 mmol). La mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (20:1). Se obtienen 159 mg (68%) de **1.13**

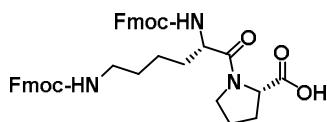
como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

#### Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-O<sup>t</sup>Bu (1.14)



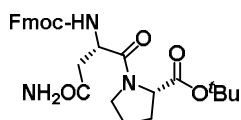
Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de **1.12**, se hacen reaccionar Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (300 mg, 0.51 mmol), PyBOP (317 mg, 0.61 mmol), H-Pro-O<sup>t</sup>Bu.HCl (116 mg, 0.56 mmol) y TEA (106  $\mu$ L, 0.76 mmol). El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (20:1). Se obtienen 335 mg (88%) de **1.14** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

#### Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (1.15)



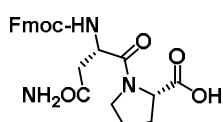
Siguiendo el procedimiento descrito para la formación de **1.13**, se hace reaccionar **1.14** (671 mg, 0.90 mmol) con TFA (1.38 mL, 18.00 mmol) en diclorometano (4.5 mL). El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 586 mg (95%) de **1.15** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

#### Fmoc-Asn-Pro-O<sup>t</sup>Bu (1.16)



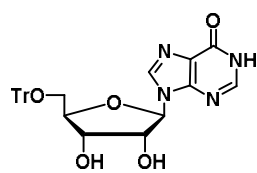
Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de **1.12**, se hace reaccionar Fmoc-Asn-OH (500 mg, 1.41 mmol), PyBOP (880 mg, 1.69 mmol), H-Pro-O<sup>t</sup>Bu.HCl (332 mg, 1.55 mmol) y TEA (293  $\mu$ L, 2.12 mmol) en diclorometano (14 mL). El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (20:1). Se obtienen 580 mg (81%) de **1.16** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

#### Fmoc-Asn-Pro-OH (1.17)



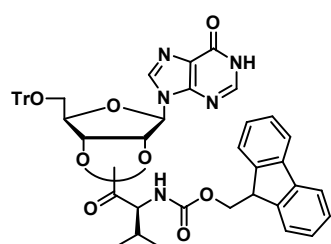
Siguiendo el procedimiento descrito para la formación de **1.13**, se hace reaccionar **1.16** (580 mg, 1.14 mmol) con TFA (1.75 mL, 22.8 mmol) en diclorometano (6.7 mL). El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 366 mg (71%) de **1.17** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>32</sup>

### 5'-O-Tritilinosina, KIN59 (1.1)



En un tubo de presión se suspende inosina (150 mg, 0.56 mmol) en piridina seca (3.75 mL). Se añade cloruro de tritilo (265 mg, 0.95 mmol) y DMAP (34 mg, 0.28 mmol). La mezcla se agita a 100 °C durante una hora. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad a presión reducida. El crudo obtenido es purificado por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 185 mg (65%) de **1.1** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>47</sup>

### 2'(3')-O-[N-((Fluoren-9-il)metoxycarbonil)-valil]-5'-O-tritilinosina (1.19a,b)

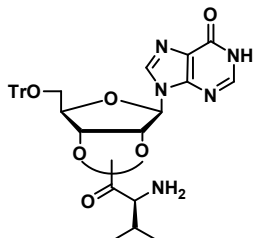


A una suspensión de Fmoc-Val-OH (120 mg, 0.35 mmol) en diclorometano seco (0.5 mL) se añaden unas gotas de DMF seca hasta la solubilización del aminoácido. A continuación, se añade diisopropilcarbodiimida (DIC) (33  $\mu$ L, 0.21 mmol) y la mezcla se agita durante 10 min a 0 °C. Aparece un precipitado blanco que se redisuelve con unas gotas de DMF seca. La mezcla se continúa agitando 10 minutos más a 0 °C y se concentra hasta sequedad a presión reducida. Se obtiene un sólido blanco que contiene el anhídrido.

A una disolución de **1.1** (90 mg, 0.18 mmol) y DMAP (2 mg, 0.02 mmol) en DMF seca (0.8 mL) se añade el anhídrido, previamente formado, y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluye con diclorometano (20 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (15 mL), una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) y salmuera (15 mL), se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 109 mg (50%) de **1.19a,b** como un sólido blanco. El espectro de <sup>1</sup>H RMN indica que se trata de una mezcla de los productos acilados en 3' y 2' en una relación 2:1, siendo mayoritario el acilado en la posición 3'. **EM** (ES, positivo): m/z 832 (M+1)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.83-0.89 (2d, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>), 2.12 (m, 1H,  $\beta$ -CH), 3.22 (m, H-5'<sub>min</sub>), 3.25 (m, H-5'<sub>may</sub>), 4.05-4.28 (m, 5H, H-4'<sub>min</sub>, H-4'<sub>may</sub>,  $\alpha$ -CH, CH-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.68 (m, H-3'<sub>min</sub>), 4.97 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.34 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.75 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.91 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.14 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.19-7.41 (m, 19H, Ph, H<sub>2,7</sub>-Fmoc, H<sub>3,6</sub>-Fmoc), 7.72 (m, 2H, H<sub>1,8</sub>-Fmoc), 7.82 (d, 1H, NH, Val), 7.87 (m, 2H, H<sub>4,5</sub>-Fmoc), 7.94 (s, 1H, H-2), 8.23 (s, 1H, H-8), 12.40 (s ancho, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): isómero mayoritario  $\delta$  18.6, 19.7 (C- $\gamma$  Val), 30.7 (C- $\beta$  Val), 47.3 (CH-Fmoc), 60.1 (C- $\alpha$  Val), 64.2 (C-5'), 66.5 (CH<sub>2</sub>-Fmoc), 71.9 (C-2'), 73.5 (C-3'), 81.7 (C-4'), 86.9 (CPh<sub>3</sub>), 86.9 (C-1'), 120.7, 120.8 (C<sub>4,5</sub>-Fmoc), 125.3 (C-5),

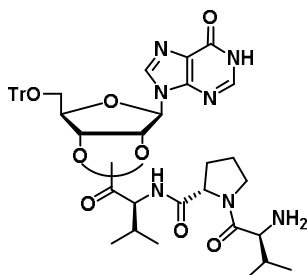
125.9, 126.0 (C<sub>1,8</sub>-Fmoc), 127.7, 127.8 (C<sub>3,6</sub>-Fmoc), 127.9, 128.3, 128.5, 128.6, 128.8, 128.9, 129.6, 144.1 (Ph, C<sub>2,7</sub>-Fmoc), 141.4 (C8), 144.4, 144.5 (C<sub>1a</sub>-, C<sub>4a</sub>-, C<sub>5a</sub>-, C<sub>8a</sub>-Fmoc), 146.6 (C2), 149.0 (C4), 157.1, 157.2 (C6, CO-Fmoc), 171.4 (CO Val).

### 2'-(3')-O-Valil-5'-O-tritilinosina (1.8a,b)



A una disolución de **1.19a,b** (217 mg, 0.26 mmol) en diclorometano (2.6 mL) se añade piperidina (258  $\mu$ L, 2.6 mmol). La reacción se agita durante 1h a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente un gradiente de diclorometano/MeOH (10:1 a 5:1). Se obtienen 152 mg (96%) de **1.8a,b** como un sólido blanco, mezcla de productos acilados en 3' y 2'. **EM** (ES, positivo): m/z 610 (M+1)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.81 (m, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub>), 1.85 (m, 1H,  $\beta$ -CH), 3.19 (m, 2H, H-5'<sub>may</sub>, H-5'<sub>min</sub>), 4.05 (m, H-4'<sub>min</sub>), 4.17 (m,  $\alpha$ -CH, H-4'<sub>may</sub>), 4.64 (m, H-3'<sub>min</sub>), 4.94 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.31 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.71 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.91 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.13 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.10-7.46 (m, 15H, Ph), 7.94 (s, 1H, H-2), 8.22 (s, 1H, H-8).

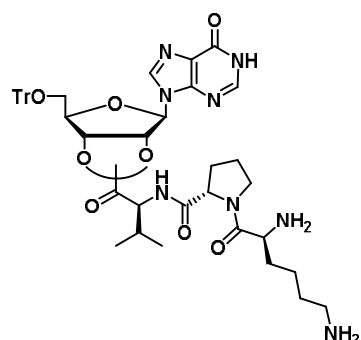
### 2'-(3')-O-(Valil-prolil-valil)-5'-O-tritilinosina (1.9a,b)



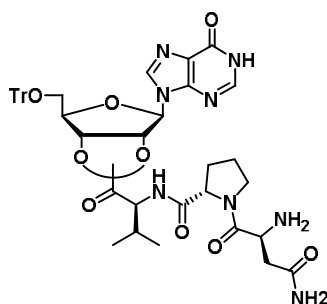
A una disolución de **1.8a,b** (50 mg, 0.08 mmol) en diclorometano (0.4 mL) se le añade PyBOP (51 mg, 0.10 mmol), Fmoc-Val-Pro-OH (**1.13**) (47 mg, 0.11 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA) (14  $\mu$ L, 0.08 mmol). La reacción se deja agitando durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con diclorometano (15 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (10 mL), una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y salmuera (10 mL), se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora. Se obtiene un aceite que se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Las fracciones que contienen el producto se vuelve a purificar por CCTLC empleando como eluyente AcOEt/MeOH (10:1). El producto obtenido (34 mg, 0.03 mmol) se disuelve en diclorometano (0.3 mL), se le añade piperidina (33  $\mu$ L, 0.33 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1.5h. Se concentra a sequedad a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente un gradiente de diclorometano/MeOH (10:1 a 5:1). Se obtienen 25 mg (37%) de **1.9a,b** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): m/z 806 (M+1)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.79-0.88 (m, 12H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Val), 1.72 (m, 1H,  $\beta$ -CH Val), 1.84 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.00 (m,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.09 (m, 1H,  $\beta$ -CH Val), 3.19 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Val), 3.27 (m, 2H, H-5'<sub>may</sub>, H-5'<sub>min</sub>), 3.45-3.57 (m, 2H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro),

4.08 (m, H-4'<sub>min</sub>), 4.18 (m, H-4'<sub>may</sub>), 4.24-4.57 (m, 2H, α-CH Val, α-CH Pro), 4.64 (m, H-3'<sub>min</sub>), 4.96 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.34 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.72 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.91 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.13 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.21-7.40 (m, 15H, CPh<sub>3</sub>), 7.92 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-8). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Isómero mayoritario δ 17.1, 17.8, 18.8, 19.5 (C-γ Val), 24.4 (C-γ Pro), 28.6 (C-β Pro), 30.0, 31.4 (C-β Val), 46.6 (C-δ Pro), 57.1 (C-α Val), 58.7 (C-α Pro), 63.4 (C-5'), 71.2 (C-2'), 72.9 (C-3'), 80.9 (C-4'), 86.2 (CPh<sub>3</sub>), 87.4 (C-1'), 124.6 (C-5), 127.0, 127.7, 128.1, 143.3 (Ph), 138.7 (C-8), 145.7 (C-2), 148.2 (C-4), 156.4 (C-6), 170.3 (CO Lys), 173.6 (CO Val), 171.8 (CO Pro). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.7 min (98%) en el método 1; 2.6 min (98%) en el método 2.

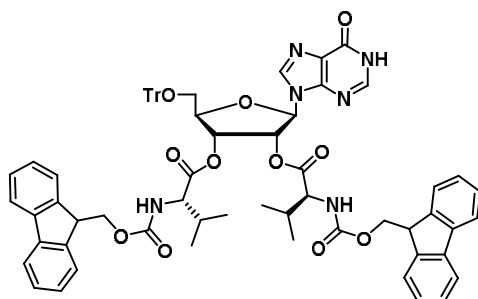
## 2'(3')-O-(Lisil-prolil-valil)-5'-O-tritilinosina (1.10a,b)



Seguendo el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **1.9a,b**, se hace reaccionar **1.8a,b** (41 mg, 0.07 mmol), PyBOP (42 mg, 0.08 mmol), DIPEA (12 μL, 0.07 mmol) y Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**1.15**) (60 mg, 0.09 mmol). El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Las fracciones que contienen el producto se vuelven a purificar por CCTLC empleando como eluyente AcOEt/EtOH/Éter (4:1:1). El producto obtenido (50 mg, 0.04 mmol) se hace reaccionar con piperidina (39 μL, 0.39 mmol). El crudo resultante se coevapora varias veces con diclorometano y se lava con éter etílico (3x5 mL) obteniéndose 28 mg (49%) de **1.10a,b** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): *m/z* 590 (M+1)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 0.87 (m, 6H, γ-CH<sub>3</sub> Val), 1.20-1.50 (m, 6H, β-CH<sub>2</sub> Lys, γ-CH<sub>2</sub> Lys, δ-CH<sub>2</sub> Lys), 1.71-1.95 (m, 4H, β-CH<sub>2</sub> Pro, γ-CH<sub>2</sub> Pro), 2.06 (m, 1H, β-CH Val), 2.61-2.73 (m, 2H, ε-CH<sub>2</sub> Lys), 3.24-3.60 (m, 4H, H-5'<sub>min</sub>, H-5'<sub>may</sub>, δ-CH<sub>2</sub> Pro, α-CH Lys), 4.08 (m, H-4'<sub>min</sub>), 4.18 (m, H-4'<sub>may</sub>), 4.29 (m, 1H, α-CH Val), 4.50 (m, 1H, α-CH Pro), 4.64 (m, H-3'<sub>min</sub>), 4.95 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.35 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.73 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.91 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.13 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.15-7.47 (m, 15H, CPh<sub>3</sub>), 7.92 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-8). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): Isómero mayoritario δ 17.8, 18.8 (C-γ Val), 22.1 (C-γ Lys), 24.3 (C-γ Pro), 28.5 (C-β Pro), 30.0, 30.2 (C-β Val, C-δ Lys), 34.5 (C-β Lys), 45.8 (C-ε Lys), 46.4 (C-δ Pro), 52.2 (C-α Lys), 57.1 (C-α Val), 58.7 (C-α Pro), 63.4 (C-5'), 71.2 (C-2'), 72.7 (C-3'), 80.9 (C-4'), 86.2 (CPh<sub>3</sub>), 87.4 (C-1'), 124.6 (C-5), 127.0, 127.7, 128.1, 143.3 (Ph), 138.7 (C-8), 145.8 (C-2), 148.2 (C-4), 156.5 (C-6), 170.3 (CO Lys), 171.8 (CO Pro), 173.9 (CO Val). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.5 min (99%) en el método 1; 2.4 min (99%) en el método 2.

**2'(3')-O-(Asparagil-prolil-valil)-5'-O-tritilinosina (1.11a,b)**

Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **1.9a,b**, se hacen reaccionar **1.8a,b** (84 mg, 0.14 mmol), PyBOP (86 mg, 0.16 mmol), DIPEA (24  $\mu$ L, 0.14 mmol) y Fmoc-Asn-Pro-OH (**1.17**) (82 mg, 0.18 mmol). El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1) y se repurifica empleando como eluyente AcOEt/EtOH/Éter (4:1:1). El producto obtenido (48 mg, 0.05 mmol) se hace reaccionar con piperidina (46  $\mu$ L, 0.46 mmol). El crudo resultante se coevapora varias veces con diclorometano y se lava con éter etílico (3 x 2 mL) y con  $t$ BuOMe (2 x 2 mL) obteniéndose 19 mg (17%) de **1.11a,b** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  576 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.82-0.87 (m, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Val), 1.80-1.86 (m, 4H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.07-2.17 (m, 2H,  $\beta$ -CH Val,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Asn), 2.34-2.38 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Asn), 3.25 (m, 2H, H-5'), 3.49 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.60 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.83 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Asn), 4.09 (m, H-4'<sub>min</sub>), 4.13-4.23 (m, H-4'<sub>may</sub>,  $\alpha$ -CH Val), 4.43 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Pro), 4.68 (m, H-3'<sub>min</sub>), 4.97 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.31 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.56 (d,  $J$  = 6.1 Hz, OH<sub>min</sub>), 5.73 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.85 (d,  $J$  = 6.1 Hz, OH<sub>may</sub>), 5.90 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.10 (m, H-1'<sub>min</sub>), 6.89 (s, 1H, NH), 7.22-7.35 (m, 15H, CPh<sub>3</sub>), 7.46 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-8). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): Isómero mayoritario  $\delta$  18.6, 19.5 (C- $\gamma$  Val), 24.7 (C- $\gamma$  Pro), 29.5 (C- $\beta$  Pro), 30.2 (C- $\beta$  Val), 40.6 (C- $\beta$  Asn), 46.9 (C- $\delta$  Pro), 49.9 (C- $\alpha$  Asn), 58.0 (C- $\alpha$  Val), 59.5 (C- $\alpha$  Pro), 64.0 (C-5'), 71.6 (C-2'), 73.3 (C-3'), 81.5 (C-4'), 86.7 (CPh<sub>3</sub>), 87.8 (C-1'), 125.1 (C-5), 127.5, 128.3, 128.7, 143.8 (Ph), 139.4 (C-8), 146.3 (C-2), 148.7 (C-4), 156.9 (C-6), 170.8 (CO Asn), 172.2 (CO Pro), 173.0 (CO Val). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.7 min (100%) en el método 3; 5.1 min (67%) y 5.2 min (29%) en el método 4.

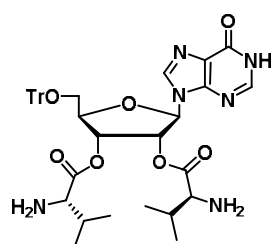
**2',3'-Di-O-[N-((fluoren-9-il)metoxycarbonil)-valil]-5'-O-tritilinosina (1.20)**

A una suspensión de Fmoc-Val-OH (332 mg, 0.98 mmol) en diclorometano seco (0.6 mL) se añaden unas gotas de DMF seca hasta la solubilización del aminoácido. A continuación, se añade DIC (75  $\mu$ L, 0.48 mmol) y la mezcla se agita durante 10 min a 0 °C. Aparece un precipitado blanco que se redissuelve con unas gotas de DMF seca. La mezcla se continúa agitando 10 minutos más a 0 °C y se concentra hasta sequedad a presión reducida. Se obtiene un sólido blanco que contiene el anhídrido.

## Parte experimental

A una disolución de **1.1** (100 mg, 0.20 mmol) y DMAP (5 mg, 0.04 mmol) en DMF seca (1.0 mL) se añade el anhídrido, previamente formado, y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluye con diclorometano (20 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (15 mL), una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (15 mL) y salmuera (15 mL), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 134 mg (58%) de **1.20** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  1153 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  0.74-0.81 (m, 12H,  $\gamma\text{-CH}_3$ ), 2.03 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}$ ), 4.02-4.29 (m, 10H, H-4', H-5',  $\alpha\text{-CH}$ , CH-Fmoc,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 5.75 (m, 1H, H-3'), 6.08 (m, 1H, H-2'), 6.19 (m, 1H, H-1'), 7.21-7.38 (m, 23H, Ph,  $\text{H}_{2,7}\text{-Fmoc}$ ,  $\text{H}_{3,6}\text{-Fmoc}$ ), 7.66 (m, 4H,  $\text{H}_{1,8}\text{-Fmoc}$ ), 7.86 (m, 4H,  $\text{H}_{4,5}\text{-Fmoc}$ ), 7.94 (s, 1H, H-2), 8.21 (s, 1H, H-8), 12.36 (s ancho, 1H, NH).

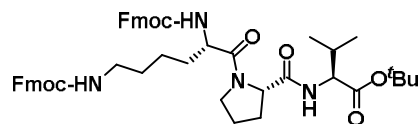
### 2',3'-Di-O-valil-5'-O-tritilinosina (1.21)



A una disolución de **1.20** (74 mg, 0.06 mmol) en diclorometano (0.7 mL) se añade piperidina (63  $\mu\text{L}$ , 0.64 mmol). La reacción se agita durante 1.5 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente un gradiente de diclorometano/MeOH (10:1 a 5:1). Obtenemos 41 mg (95%) de **1.21** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  708 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  0.75-0.87 (m, 12H,  $\gamma\text{-CH}_3$ ), 1.83 (m, 2H,  $\beta\text{-CH}$ ), 3.15 (m, 2H, H-5'), 3.28 (m, 2H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 4.25 (m, 1H, H-4'), 5.72 (m, H-3'), 6.05 (m, 1H, H-2'), 6.21 (m, 1H, H-1'), 7.23-7.35 (m, 15H, Ph), 7.96 (s, 1H, H-2), 8.25 (s, 1H, H-8).

## 5.3. Síntesis de conjugados tetrapeptídicos del KIN59

### Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-O<sup>t</sup>Bu (1.25)

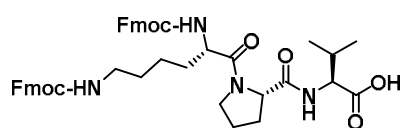


A una disolución de **1.15** (956 mg, 1.39 mmol) en diclorometano (14 mL) se añade PyBOP (868 mg, 1.67 mmol), H-Val-O<sup>t</sup>Bu (321 mg, 1.52 mmol) y TEA (290  $\mu\text{L}$ , 2.08 mmol). La mezcla se calienta a 40 °C por irradiación al microondas durante una hora y media. La mezcla de reacción se diluye con diclorometano (30 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (20 mL), una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL) y salmuera (20 mL), se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (40:1). Se obtienen 767 mg (65%) de **1.25** como un sólido blanco.



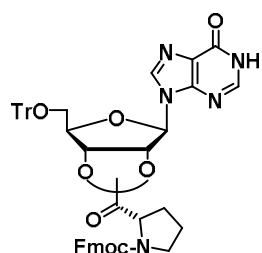
**EM** (ES, positivo):  $m/z$  843 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.77-0.85 (m, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Val), 1.33 (m, 13H, <sup>t</sup>Bu,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.51 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.84 (m, 3H,  $\beta$ -CH Val,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 1.97 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.93 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 3.49 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.57 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 4.01 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Lys), 4.14-4.26 (m, 7H,  $\alpha$ -CH Val, CH-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.44 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Pro), 7.28 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, H<sub>2,7</sub>-Fmoc), 7.37 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 4H, H<sub>3,6</sub>-Fmoc), 7.67 (m, 4H, H<sub>1,8</sub>-Fmoc), 7.85 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 4H, H<sub>4,5</sub>-Fmoc).

### Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-Val-OH (1.26)



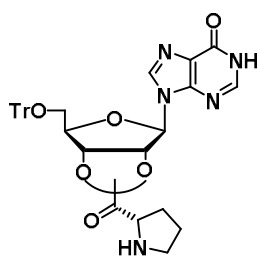
A una disolución de **1.25** (767 mg, 0.90 mmol) en diclorometano (4.5 mL) se añade TFA (1.4 mL, 18.20 mmol). La mezcla se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad a presión reducida. Se obtienen 568 mg (80%) de **1.26** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  787 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0.84 (m, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Val), 1.31 (m, 4H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.51 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.83 (m, 3H,  $\beta$ -CH Val,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 1.98 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.93 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 3.49 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.57 (m, 1H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 4.08-4.26 (m, 8H,  $\alpha$ -CH Lys,  $\alpha$ -CH Val, CH-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.45 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Pro), 7.28 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, H<sub>2,7</sub>-Fmoc), 7.37 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, H<sub>3,6</sub>-Fmoc), 7.66 (m, 4H, H<sub>1,8</sub>-Fmoc), 7.85 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 4H, H<sub>4,5</sub>-Fmoc).

### 2'-(3'-O-[N-((Fluoren-9-il)metoxycarbonil)-prolil]-5'-O-tritilinosina (1.27a,b)



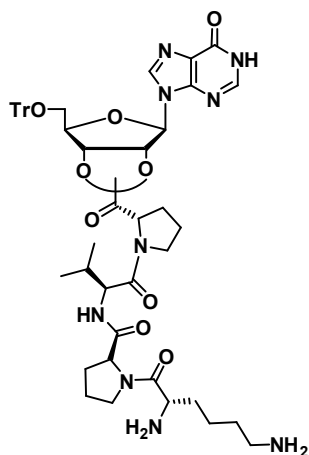
A una disolución de Fmoc-Pro-OH (93 mg, 0.27 mmol) en DMF anhidra (0.6 mL) se añade DIC (22  $\mu$ L, 0.14 mmol) y la mezcla se agita durante 20 min a 0 °C. A esta disolución se añade otra que contiene **1.1** (100 mg, 0.20 mmol) en DMF seca (1.0 mL) y se agita a 0 °C durante 5 horas. Se añade agua (10.0 mL) y diclorometano (20.0 mL). La fase orgánica se decanta, se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 50 mg (60%) de **1.27a,b** como un sólido blanco. El espectro de <sup>1</sup>H RMN indica que se trata de una mezcla de los productos acilados en 3' y 2', siendo mayoritario el acilado en la posición 3'. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  830 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.90 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.24 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.20 (m, 2H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.44 (m, H-5'<sub>may</sub>, H-5'<sub>min</sub>), 4.23 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH-Fmoc, H-4'<sub>may</sub>, H-4'<sub>min</sub>,  $\alpha$ -CH Pro), 4.66 (m, H-3'<sub>min</sub>), 5.02 (m, 1H, H-2'<sub>may</sub>), 5.30 (m, 1H, H-3'<sub>may</sub>), 5.74 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.97 (m, 1H, H-1'<sub>may</sub>), 6.14 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.19-7.41 (m, 23H, Ph, H-Fmoc), 7.89 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-8).

### 2'(3')-O-Prolil-5'-O-tritilinosina (1.23a,b)



A una disolución de **1.27a,b** (243 mg, 0.29 mmol) en diclorometano (3.0 mL) se le añade piperidina (290  $\mu$ L, 2.9 mmol). La reacción se agita durante 1h a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente un gradiente de diclorometano/MeOH (10:1 a 5:1) y se utiliza inmediatamente para el siguiente paso. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  608 ( $M+1$ )<sup>+</sup>.

### 2'(3')-O-(Lisil-prolil-valil-prolil)-5'-O-tritilinosina (1.24a,b)

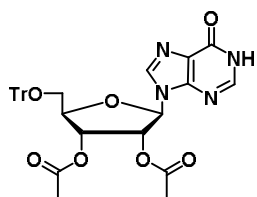


Siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis del compuesto **1.9a,b**, se hacen reaccionar **1.23a,b** (110 mg, 0.18 mmol), PyBOP (112 mg, 0.22 mmol), DIPEA (32  $\mu$ L, 0.18 mmol) y Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (185 mg, 0.24 mmol). El crudo obtenido se purifica por CCTLC en el Cromatotrón usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1) y se repurifica empleando como eluyente AcOEt/EtOH/Éter (4:1:1). El producto obtenido (50 mg, 0.04 mmol) se hace reaccionar con piperidina (39  $\mu$ L, 0.39 mmol). El crudo resultante se coevapora varias veces con diclorometano y se lava con éter

etílico (2 x 1 mL) y <sup>t</sup>BuOMe (2 x 1 mL) obteniéndose 28 mg (15%) de **1.24a,b** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  932 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.85 (m, 6H,  $\gamma$ -CH<sub>3</sub> Val), 1.28-1.52 (m, 6H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Lys,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Lys), 1.83 (m, 6H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro, 2 x  $\gamma$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.07 (m, 2H,  $\beta$ -CH Val,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.17 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 2.70 (m, 2H,  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> Lys), 3.25-3.45 (m, 3H, H-5'<sub>min</sub>, H-5'<sub>may</sub>,  $\alpha$ -CH Lys), 3.54 (m, 2H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 3.63 (m, 2H,  $\delta$ -CH<sub>2</sub> Pro), 4.18 (m, 1H, H-4'<sub>min</sub>, H-4'<sub>may</sub>), 4.27 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Pro), 4.38 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Val), 4.50 (m, 1H,  $\alpha$ -CH Pro), 4.61 (m, H-3'<sub>min</sub>), 5.04 (m, H-2'<sub>may</sub>), 5.35 (m, H-3'<sub>may</sub>), 5.81 (m, H-2'<sub>min</sub>), 5.91 (m, H-1'<sub>may</sub>), 6.14 (m, H-1'<sub>min</sub>), 7.24-7.35 (m, 15H, CPh<sub>3</sub>), 7.93 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-8). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.5 min (94%) en el método 3; 4.5 min (51%) y 4.6 min (42%) en el método 4.

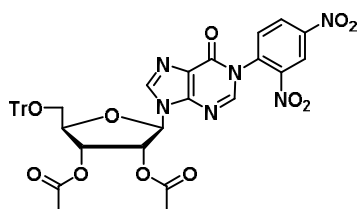
#### 5.4. Síntesis de profármacos de 1-[2-amino-(2-etoxi)etoxietil]-5'-O-tritilinosina

##### 2',3'-Di-O-acetil-5'-O-tritilinosina (1.30)



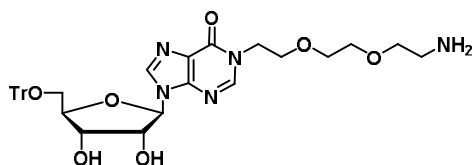
A una disolución de **1.1** (335 mg, 0.66 mmol) en piridina seca (2.5 mL) se añade anhídrido acético (620  $\mu$ L, 6.56 mmol).<sup>46</sup> La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se concentra a sequedad a presión reducida y el crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (10:1). Se obtienen 374 mg (95%) de **1.30** como un sólido blanco. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>47</sup>

##### 2',3'-Di-O-acetil-1-(2,4-dinitrofenil)-5'-O-tritilinosina (1.31)



Una disolución que contiene **1.30** (1.3 g, 2.14 mmol), 1-cloro-2,4-dinitrobenzo (1.1 g, 5.36 mmol), y  $K_2CO_3$  (746 mg, 5.36 mmol) en DMF (11 mL) se agita a 80 °C durante 1h. La mezcla de reacción se concentra a sequedad, se disuelve en AcOEt, se lava con agua, se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/metanol (50:1). Se obtiene 1.0 g (64%) de **1.31** como un sólido amarillo. Los datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la bibliografía.<sup>47</sup>

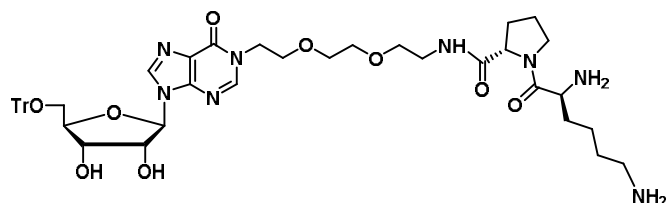
##### 1-[2-Amino-(2-etoxi)etoxietil]-5'-O-tritilinosina (1.29)



A una disolución de **1.31** (800 mg, 1.05 mmol) en DMF (7.4 mL) se añade 2-[2-(2-aminoethoxy)etoxi]etilamina (1.6 mL, 10.52 mmol) y se calienta a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluye en diclorometano y se lava con agua. La fase orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  anhidro se filtra y se evapora. El crudo resultante se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/metanol: $NH_3$  0.7N (20:1 a 10:1). Se obtienen 348 mg (52%) de **1.29** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): m/z 383 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  2.54 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2 x  $CH_2NH_2$ ), 3.20 (m, 2H, H-5'), 3.26 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H,  $OCH_2$ ), 3.40 (m, 2H,  $OCH_2$ ), 3.49 (m, 2H,  $OCH_2$ ), 3.65 (m, 2H,  $OCH_2$ ), 4.06 (m, 1H, H-4'), 4.14-4.22 (m, 3H,  $NCH_2$ , H-3'), 4.57 (m, 1H, H-2'), 5.87 (m, 1H, H-1'), 7.23-7.34 (m, 15H, Ph), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.19 (s, 1H, H-8). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  41.6 ( $CH_2NH_2$ ), 45.8 ( $NCH_2$ ), 64.4 (C-5'), 68.2 ( $OCH_2$ ), 69.9 ( $OCH_2$ ), 70.0 ( $OCH_2$ ), 70.7 (C-3'), 73.0 ( $OCH_2$ ), 73.7 (C-2'), 83.6 (C-4'), 86.5 (CPh<sub>3</sub>),

88.4 (C-1'), 124.9 (C-5), 127.5, 128.3, 128.7, 144.0 (Ph), 139.7 (C-4), 147.8 (C-2), 149.4 (C-8), 156.3 (C-6). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.7 min (100%) en el método 3; 4.9 min (99%) en el método 4.

### 1-[2-(N-L-Prolil-L-lisil)amino-(2-etoxi)etoxietil]-5'-O-tritilinosina (1.32)



A una disolución de **1.29** (150 mg, 0.23 mmol) en diclorometano (1.2 mL) se añade HCTU (116 mg, 0.28 mmol), Fmoc-Lys(Fmoc)-Pro-OH (**1.15**) (177 mg, 0.26 mmol) y

DIPEA (80  $\mu$ L, 0.46 mmol). La reacción se deja agitando durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se diluye con diclorometano (20 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (15 mL), con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (15 mL) y salmuera (15 mL), se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora. Se obtiene un crudo que se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (15:1). El producto obtenido (250 mg, 0.19 mmol) se disuelve en diclorometano (1.9 mL), se le añade piperidina (188  $\mu$ L, 1.90 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 1.5 h. La mezcla de reacción se concentra hasta sequedad a presión reducida. El bruto obtenido se lava con éter dietílico (3 x 1 mL), se disuelve en diclorometano y se añade éter. El sólido formado se aísla por filtración. Se obtienen 124 mg (62%) de **1.32** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  608 ( $M+1$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  1.35 (m,  $\gamma\text{-CH}_2$  Lys), 1.50 (m, 2H,  $\delta\text{-CH}_2$  Lys), 1.60-1.87 (m, 4H,  $\beta\text{-CH}_2$  Lys,  $\gamma\text{-CH}_2$  Pro), 2.04 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$  Pro), 2.13 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$  Pro), 2.73 (m, 2H,  $\epsilon\text{-CH}_2$  Lys), 3.10-3.33 (m, 7H,  $\alpha\text{-CH}$  Lys,  $\delta\text{-CH}_2$  Pro, 2 x  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.50 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.66 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 4.06 (m, 1H,  $\text{H}_4'$ ), 4.17 (m, 3H,  $\text{H-3}'$ ,  $\text{NCH}_2$ ), 4.30 (m, 1H,  $\alpha\text{-CH}$  Pro), 4.54 (m, 1H,  $\text{H-2}'$ ), 5.58 (m, 1H,  $\text{H-1}'$ ), 7.24-7.36 (m, 15H, Ph), 8.21 (s, 1H,  $\text{H-2}$ ), 8.25 (s, 1H,  $\text{H-8}$ ). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  21.7 (C- $\gamma$  Lys), 25.0 (C- $\gamma$  Pro), 27.1 (C- $\delta$  Lys), 28.8 (C- $\beta$  Pro), 32.0 (C- $\beta$  Lys), 39.0 (C- $\epsilon$  Lys), 45.2 (C- $\delta$  Pro), 45.8 ( $\text{NCH}_2$ ), 47.2 ( $\text{NCH}_2$ ), 51.7 (C- $\alpha$  Lys), 59.9 (C- $\alpha$  Pro), 64.4 (C-5'), 68.3 ( $\text{OCH}_2$ ), 69.4 ( $\text{OCH}_2$ ), 69.9 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.0 ( $\text{OCH}_2$ ), 70.7 (C-3'), 73.8 (C-2'), 83.7 (C-4'), 86.5 (CPh), 88.2 (C-1'), 124.2 (C-5), 127.5, 128.3, 128.7, 144.0 (Ph), 139.7 (C-2), 147.9 (C-4), 149.3 (C-8), 156.3 (C-6), 166.1 (CO Lys), 179.0 (CO Pro). **HPLC** tiempo de retención (% área): 3.4 min (91%) en el método 3; 4.2 min (94%) en el método 4.

### **5.5. Medidas experimentales de solubilidad**

Se agita una suspensión con exceso del profármaco, o del fármaco patrón, en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se filtra y el filtrado se analiza por HPLC. Se ha realizado en un cromatógrafo Aligent Technologies 1120 Compact LC utilizando una columna de fase reversa ACE 5 C-18-300 (150 x 4.6 mm), empleando un detector Photodiode Array (PDA), flujo 1 mL/min y como fase móvil: A: ACN y B: H<sub>2</sub>O con 0.05% de TFA. Cuando la absorbancia excede los valores de la recta de calibrado, la muestra se diluye en PBS hasta el rango empleado en la curva de calibrado. La solubilidad se calcula interpolando el área del pico obtenido por HPLC a 254 nm en la recta de calibrado, que se obtiene a partir de concentraciones conocidas de dicha muestra que se preparan a partir de una disolución patrón en DMSO. Se emplearon distintos tipos de gradientes según el profármaco o fármaco a analizar.

### **5.6. Ensayos de estabilidad química en tampón fosfato**

Para llevar a cabo estos ensayos se prepararon disoluciones de cada profármaco a estudiar en PBS de concentraciones finales 50 µM a partir de disoluciones patrón 50 mM en DMSO y se incubaron a 37 °C. Se analizan alícuotas de 100 µL a determinados periodos de tiempo (0h, 25', 1h, 2h, 6h, 24h) en un cromatógrafo HPLC Aligent Technologies 1120 Compact LC utilizando una columna de fase reversa ACE 5 C-18-300 (150 x 4.6 mm), empleando un detector Photodiode Array (PDA) y como fase móvil: A: ACN y B: H<sub>2</sub>O con 0.05% de TFA. En todos los casos el flujo fue de 1mL/min y se emplearon distintos tipos de gradientes para la correcta separación de los picos observados en el cromatograma correspondientes a los profármacos y al fármaco patrón que existe en la disolución en el momento de la medida.

### **5.7. Ensayos enzimáticos frente a DPP-IV/CD26 purificada y ensayos en suero humano (SH)**

Los ensayos se realizaron en tubos Eppendorf a 37 °C. A cada tubo se añaden 6 µL de DPP-IV/CD26 (concentración final: 24 y 14 miliunidades/mL) ó 120 µL de SH (concentración final: 20% SH en PBS) y una disolución 50 µM en DMSO del compuesto a ensayar, junto con PBS hasta un volumen total de 600 µL. El pH de la reacción fue de 7.4, el cual es virtualmente idéntico al pH del plasma. La reacción comienza mediante la adición de la enzima o el suero correspondiente sobre una disolución del compuesto. A tiempos determinados se toman alícuotas de 100 µL de la mezcla de

reacción y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de MeOH frío para precipitar las proteínas. Después de 10 min en hielo, los contenidos del tubo se centrifugan y el sobrenadante se analiza por HPLC en un aparato Pharmacia LKB Biotechnologies 2141 utilizando una columna de fase reversa Lichrocart Superspher 60 RP-8. Fase móvil: A (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  más 5 mM de ácido heptano sulfónico) ó  $\text{H}_2\text{O}$  (TFA 0.05%) y B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min. Detección: detector Photodiode Array (PDA). Se emplearon distintos gradientes para la correcta separación de los picos observados en el cromatograma correspondientes a los profármacos y al fármaco patrón.

### **5.8. Ensayo CAM en huevos fecundados**

Los ensayos CAM de angiogénesis “*in vivo*” se han realizado siguiendo la metodología descrita por Maragoudaskis y col.,<sup>48</sup> y previamente aplicada a otros compuestos de esta familia.

Los huevos fertilizados se incubaron durante 3 días a 37 °C. A continuación, y tras retirar 3 mL de albúmina se abrió una ventana en la cascara del huevo para acceder a la membrana corioalantoidea (CAM). Esta ventana se cubrió con cinta de celofán y los huevos se incubaron durante 9 días más antes de añadir los compuestos en estudio. Los compuestos, a las concentraciones ensayadas, se sembraron en discos de 8 mm de diámetro y se llevaron a sequedad en condiciones estériles. También se añadió a los discos una disolución de acetato de cortisona (100  $\mu\text{g}$ /disco) para evitar una respuesta inflamatoria. Igualmente, en cada ensayo, se colocó un disco vacío a una distancia aproximada de un 1 cm de lugar donde se colocaron los discos con los compuestos. A continuación, se cubrieron las ventanas y los huevos se incubaron hasta el día 11, día en que se midió la respuesta angiogénica. Para ello, los huevos se rellenaron de una solución tampón de formalina al 10%, se eliminaron los discos y los huevos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se recortó el área que contenía los discos y la densidad de vasos sanguíneos se midió al microscopio siguiendo el método de Harris-Hooker.<sup>49</sup>

### **5.9. Crecimiento tumoral en ratones**

Grupos de ratones hembras atímicos *nu/nu* de ocho semanas y peso aproximado de 25 g se inocularon por vía subcutánea con células F2T.luc2.9 (100  $\mu\text{L}$  de medio conteniendo  $2 \times 10^6$  células).<sup>28</sup> El tratamiento se inició 24 h después de la inoculación y se mantuvo hasta el final del experimento (24 días). Los compuestos **1.29** y **1.32** se

administraron por vía subcutánea a una dosis de 50 mg/Kg en 10% de DMSO y 20% de cremofor en PBS una vez al día durante 6 días a la semana en un punto alejado de donde se realizó la inoculación del tumor. Se tomaron imágenes de los ratones a intervalos regulares de tiempo para determinar el crecimiento de las células tumorales luciferasa-positivas. Antes de la toma de imágenes, se administró a los ratones por vía intraperitoneal 200  $\mu$ L de una disolución de luciferina a una concentración de 40 mg/mL en PBS. Las imágenes fueron captadas con un sistema de imagen “*in vivo*” IVIS SPECTRUM de Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA, USA), y analizadas mediante el software LivingImage (Caliper Life Sc). Al concluir el experimento, los tumores fueron pesados. Todos los estudios se realizaron en cumplimiento de las instrucciones éticas de bienestar animal de la KU Leuven.





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* **2001**, *61*, 253–270.
- (2) Bergers, G.; Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 401–410.
- (3) Cross, M. J.; Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* **2001**, *22*, 201–207.
- (4) Moghaddam, A.; Zhang, H. T.; Fan, T. P.; Hu, D. E.; Lees, V. C.; Turley, H.; Fox, S. B.; Gatter, K. C.; Harris, A. L.; Bicknell, R. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 998–1002.
- (5) Miyadera, K.; Sumizawa, T.; Haraguchi, M.; Yoshida, H.; Konstanty, W.; Yamada, Y.; Akiyama, S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet- derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* **1995**, *55*, 1687–1690.
- (6) Haraguchi, M.; Komuta, K.; Akashi, A.; Furui, J.; Kanematsu, T. Occurrence of hematogenous metastasis and serum levels of thymidine phosphorylase in colorectal cancer. *Oncol Rep* **2003**, *10*, 1207–1122.
- (7) Shimaoka, S.; Matsushita, S.; Nitanda, T.; Matsuda, A.; Nioh, T.; Suenaga, T.; Nishimata, Y.; Akiba, S.; Akiyama, S.; Nishimata, H. The role of thymidine phosphorylase expression in the invasiveness of gastric carcinoma. *Cancer* **2000**, *88*, 2220–2227.
- (8) Igarashi, M.; Dhar, D. K.; Kubota, H.; Yamamoto, A.; El-Assal, O.; Nagasue, N. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* **1998**, *82*, 1225–1232.
- (9) Takao, S.; Takebayashi, Y.; Che, X.; Shinch, H.; Natsugoe, S.; Miyadera, K.; Yamada, Y.; Akiyama, S.; Aikou, T. Expression of thymidine phosphorylase is associated with a poor prognosis in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* **1998**, *4*, 1619–1624.
- (10) Mizutani, Y.; Wada, H.; Yoshida, O.; Fukushima, M.; Kawauchi, A.; Nakao, M.; Miki, T. The significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma. *Cancer* **2003**, *98*, 730–736.

- (11) Mazurek, A.; Kuc, P.; Terlikowski, S.; Laudanski, T. Evaluation of tumor angiogenesis and thymidine phosphorylase tissue expression in patients with endometrial cancer. *Neoplasma* **2006**, *53*, 242–246.
- (12) Lee, A. H.; Dublin, E. A.; Bobrow, L. G. Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* **1999**, *187*, 285–290.
- (13) Reynolds, K.; Farzaneh, F.; Collins, W. P.; Campbell, S.; Bourne, T. H.; Lawton, F.; Moghaddam, A.; Harris, A. L.; Bicknell, R. Association of ovarian malignancy with expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Natl Cancer Inst* **1994**, *86*, 1234–1238.
- (14) Kodama, J.; Yoshinouchi, M.; Seki, N.; Hongo, A.; Miyagi, Y.; Kudo, T. Angiogenesis and platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase expression in cervical cancer. *Int J Oncol* **1999**, *15*, 149–203.
- (15) O'Brien, T.; Cranston, D.; Fuggle, S.; Bicknell, R.; Harris, a L. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* **1995**, *55*, 510–513.
- (16) Sato, J.; Sata, M.; Nakamura, H.; Inoue, S.; Wada, T.; Takabatake, N.; Otake, K.; Tomoike, H.; Kubota, I. Role of thymidine phosphorylase on invasiveness and metastasis in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* **2003**, *106*, 863–870.
- (17) Vaupel, P.; Kallinowski, F.; Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* **1989**, *49*, 6449–6465.
- (18) Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* **1990**, *82*, 4–6.
- (19) Ishikawa, F.; Miyazono, K.; Hellman, U.; Drexler, H.; Wernstedt, C.; Hagiwara, K.; Usuki, K.; Takaku, F.; Risau, W.; Heldin, C. H. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* **1989**, *338*, 557–562.
- (20) Sengupta, S.; Sellers, L. A.; Matheson, H. B.; Fan, T.-P. D. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis in vivo and in vitro: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol* **2003**, *139*, 219–231.
- (21) Iltzsch, M. H.; el Kouni, M. H.; Cha, S. Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver. *Biochemistry* **1985**, *24*, 6799–6807.
- (22) Liekens, S.; Hernandez, A. I.; Ribatti, D.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J. .; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. The nucleoside derivative 5-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 29598–29605.

- (23) Casanova, E.; Hernandez, A. I.; Priego, E. M.; Liekens, S.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J. 5'-O-Tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5562–5570.
- (24) Liekens, S.; Balzarini, J.; Hernández, A. I.; De Clercq, E.; Priego, E. M.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Thymidine phosphorylase is noncompetitively inhibited by 5'-O-trityl-inosine (KIN59) and related compounds. *Nucleos Nucleot Nucl* **2006**, *25*, 975–980.
- (25) Casanova, E.; Hernandez, A. I.; Priego, E.-M.; Liekens, S.; Camarasa, M.-J.; Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J. 5'-O-tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5562–70.
- (26) Bronckaers, A.; Aguado, L.; Negri, A.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J.; Gago, F.; Liekens, S. Identification of aspartic acid-203 in human thymidine phosphorylase as an important residue for both catalysis and non-competitive inhibition by the small molecule “crystallization chaperone” 5'-O-tritylinosine (KIN59). *Biochem Pharmacol* **2009**, *78*, 231–240.
- (27) Lokman, N. a; Elder, A. S. F.; Ricciardelli, C.; Oehler, M. K. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* **2012**, *13*, 9959–9970.
- (28) Liekens, S.; Bronckaers, A.; Belleri, M.; Bugatti, A.; Sienaert, R.; Ribatti, D.; Nico, B.; Gigante, A.; Casanova, E.; Opdenakker, G.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; Presta, M. The thymidine phosphorylase inhibitor 5'-O-tritylinosine (KIN59) is an antiangiogenic multitarget fibroblast growth factor-2 antagonist. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 817–829.
- (29) Stella, V. J.; Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59*, 677–694.
- (30) Beauchamp, L. M.; Orr, G. F.; De Miranda, P.; Burnette, T.; Krenitsky, T. A. Amino acid ester prodrugs of acyclovir. *Antivir Chem Chemother* **1992**, *3*, 157–164.
- (31) Díez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; De Meester, I.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Dipeptidyl peptidase IV dependent water-soluble prodrugs of highly lipophilic bicyclic nucleoside analogues. *J Med Chem* **2011**, *54*, 1927–1942.
- (32) García Aparicio, C.; Bonache, M. C.; De Meester, I.; San Félix, A.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velazquez, S. Design and discovery of a novel dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-based prodrug approach. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5339–5351.

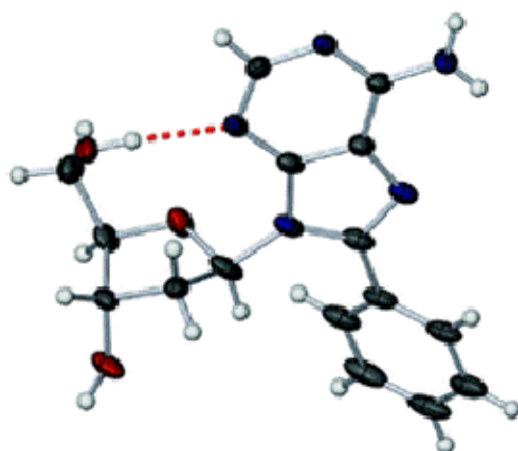
- (33) De Meester, I.; Korom, S.; Van Damme, J.; Scharpé, S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* **1999**, *20*, 367–375.
- (34) Vanhoof, G.; Goossens, F.; De Meester, I.; Hendriks, D.; Scharpe, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J* **1995**, *9*, 736–744.
- (35) Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* **1999**, *85*, 9–24.
- (36) Díez-Torrubia, A.; García-Aparicio, C.; Cabrera, S.; De Meester, I.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Application of the dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) based prodrug approach to different amine-containing drugs. *J Med Chem* **2010**, *53*, 559–572.
- (37) García-Aparicio, C.; Díez-Torrubia, A.; Balzarini, J.; Lambeir, A. M.; Velázquez, S.; Camarasa, M. J. Efficient conversion of tetrapeptide-based TSAO prodrugs to the parent drug by dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV/CD26). *Antiviral Res* **2007**, *76*, 130–139.
- (38) Díez-Torrubia, A.; Cabrera, S.; Lambeir, A. M.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26)-based prodrugs of hydroxy-containing drugs. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 618–628.
- (39) Díez-Torrubia, A. Una nueva aproximación profármaco basada en la enzima Dipeptidil-Peptidasa tipo IV. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- (40) Díez-Torrubia, A.; Cabrera, S.; Meester, I.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Velzquez, and S. Dipeptidyl peptidase IV-activated prodrugs of anti-Varicella Zoster virus bicyclic nucleoside analogues containing different self-cleavage spacer systems. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1612–1622.
- (41) Reese, C. B.; Trentham, D. R. Acyl migration in ribonucleoside derivatives. *Tetrahedron Lett* **1965**, *29*, 2467–2472.
- (42) Her, S.; Kluger, R. Biomimetic protecting-group-free 2', 3'-selective aminoacylation of nucleosides and nucleotides. *Org Biomol Chem* **2011**, *9*, 676–678.
- (43) Casanova, E.; Moreno, D.; Gigante, A.; Rico, E.; Genes, C. M.; Oliva, C.; Camarasa, M. J.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Pérez-Pérez, M. J. 5'-trityl-substituted thymidine derivatives as a novel class of antileishmanial agents: *Leishmania infantum* EndoG as a potential target. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1161–1174.
- (44) Liekens, S.; Bronckaers, A.; Hernández, A. I.; Priego, E. M.; Casanova, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. 5'-O-Tritylated nucleoside

- derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis. *Mol Pharmacol* **2006**, 70, 501–509.
- (45) De Napoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Varra, M. 1-Substituted 2'-deoxyinosine analogues. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **1997**, 14, 2079–2082.
  - (46) Hampton, A.; Nichol, A. W. Nucleotides. V. Purine ribonucleoside 2',3'-cyclic carbonates. Preparation and use for the synthesis of 5'-monosubstituted nucleosides. *Biochemistry* **1966**, 5, 2076–2082.
  - (47) Casanova, E. Nucleósidos como inhibidores del factor angiogénico timidina fosforolasa. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2008.
  - (48) Maragoudakis, M.; Sarmonika, M.; Panoutsacopoulou, M. Inhibition of basement membrane biosynthesis prevents angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* **1988**, 244, 729–733.
  - (49) Harris-Hooker, S. A.; Gajdusek, C. M.; Wight, T. N.; Schwartz, S. M. Neovascular responses induced by cultured aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **1983**, 114, 302–310.



# Capítulo 2

## **Síntesis de inosinas 8 sustituidas mediante arilación directa asistida por microondas y su evaluación biológica**

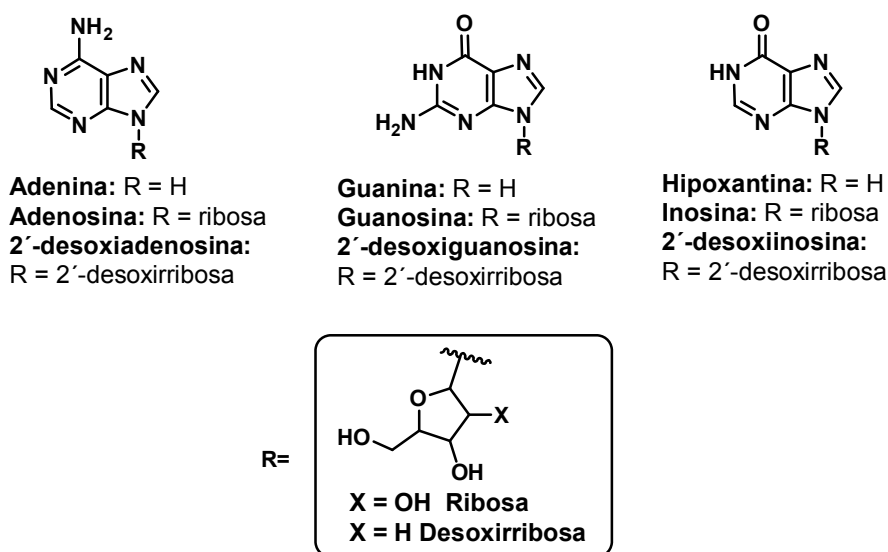






## 1. INTRODUCCIÓN

Los análogos de nucleósidos constituyen uno de los pilares básicos de la quimioterapia antiviral y anticancerosa, así como de terapias inmunomoduladoras. Además, es creciente su uso en la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos y antiparasitarios. Desde el punto de vista estructural, en un nucleósido se pueden distinguir dos fragmentos bien diferenciados: la base nitrogenada, de naturaleza púrica o pirimidínica, y el fragmento de azúcar, normalmente ribosa o 2'-desoxirribosa. Dadas las numerosas aplicaciones terapéuticas de los análogos de nucleósido, los dos fragmentos estructurales que los constituyen han sido objeto de numerosas modificaciones sintéticas en la búsqueda de compuestos farmacológicamente activos, con el fin de disponer de compuestos más selectivos y menos tóxicos en los distintos campos terapéuticos. En la figura 2.1 se representan las bases nitrogenadas y los nucleósidos de purina más habituales.



**Figura 2.1.** Bases púricas (R=H) y sus correspondientes ribo y 2'-desoxirribonucleósidos

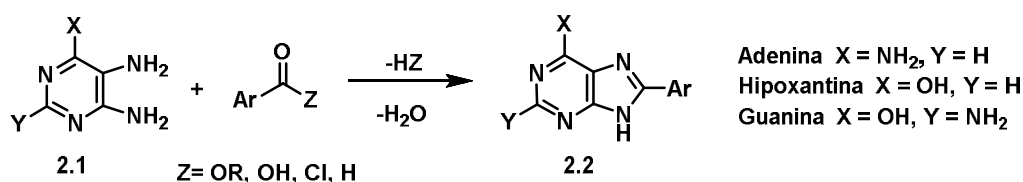
De las múltiples modificaciones que se han introducido en la base púrica de estos nucleósidos, la incorporación de sustituyentes aromáticos en la posición 8 reviste un notable interés ya que los nucleósidos 8-arilados presentan numerosas propiedades que son objeto de estudio y que abarcan desde aspectos conformacionales y toxicológicos, hasta propiedades fluorescentes y potencial terapéutico. Antes de comentar sus propiedades, conviene describir brevemente su síntesis, que implica la formación de un enlace C-C en el anillo de imidazol de la purina. “A priori” existen dos estrategias generales de síntesis: por funcionalización de la base nitrogenada y posterior reacción

de glicosidación, o por funcionalización del nucleósido ya formado, siendo esta segunda vía la más empleada.<sup>1</sup>

1- Por funcionalización de la base nitrogenada y posterior reacción de glicosidación.

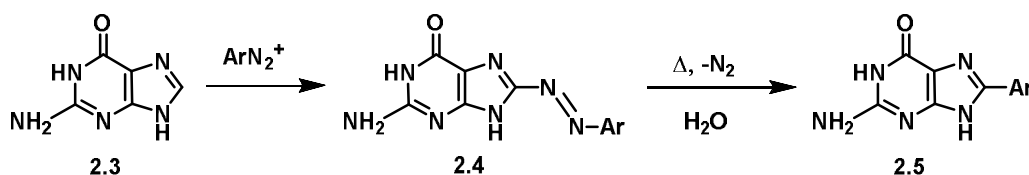
Esta ruta implica la preparación de las bases púricas con la funcionalización deseada en la posición 8 y posterior reacción de glicosidación con un donador de glicosilo. Este método presenta problemas de regioselectividad, y de estereoselectividad si el azúcar es 2'-dexoxirribosa. La base de purina 8-arilada se puede sintetizar de dos maneras:

- a. *A partir de diaminopirimidinas.* Las purinas 8 ariladas (**2.2**) se pueden obtener por tratamiento de las diaminopirimidinas (**2.1**) con ésteres, ácidos, cloruros de ácido o aldehidos aplicando calor o ácidos deshidratantes como se refleja en el esquema 2.1, y se detalla en una revisión reciente.<sup>1</sup>



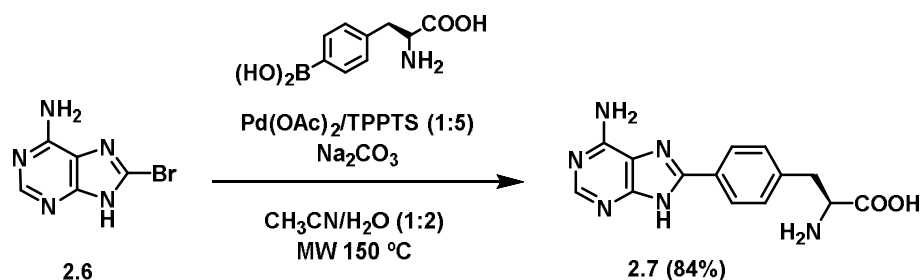
Esquema 2.1

- b. *A partir de purinas.* Stock<sup>2,3</sup> y posteriormente Gannett<sup>4</sup> han descrito la síntesis de purinas 8-ariladas a través de iones arildiazonio como se recoge en el esquema 2.2.



Esquema 2.2

Sin embargo, la ruta más habitual para obtener las purinas 8-ariladas consiste en la preparación de los 8-bromo derivados y posterior reacción de Stille<sup>5</sup> o Suzuki<sup>6,7</sup> empleando estannanos o ácidos borónicos. En el esquema 2.3 se muestra, a modo de ejemplo, la reacción de Suzuki empleando ácidos borónicos para derivados de fenilalanina.<sup>8</sup>

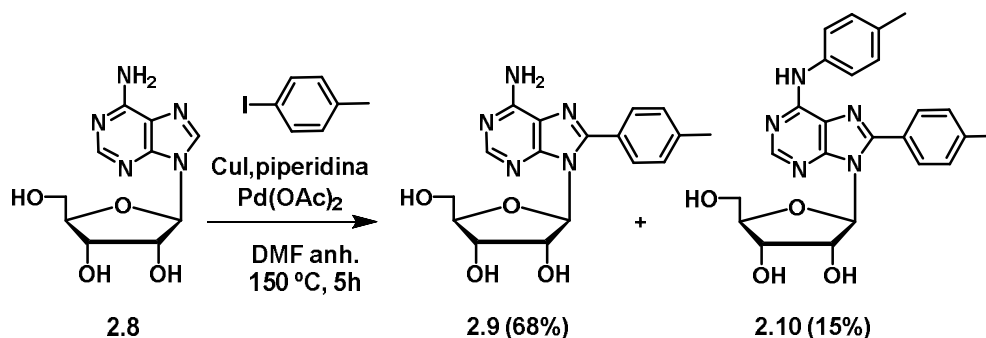


Esquema 2.3

2- Por funcionalización del nucleósido. En este caso, y de forma análoga al último apartado, se requiere de la preparación de los 8-bromo nucleósidos y posterior acoplamiento por reacción de Stille<sup>5</sup> o Suzuki,<sup>9</sup> siendo esta última la más utilizada debido a la gran variedad de ácidos borónicos y boronatos que existen en el mercado.<sup>8</sup> Las principales limitaciones de este método están asociadas a problemas de solubilidad y de aislamiento de los compuestos, así como la labilidad del enlace glicosídico cuando se emplean condiciones enérgicas de reacción. Los nucleósidos de purina “*per se*” son poco solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, siendo el disolvente más usado para este tipo de reacción la DMF. También se han ensayado condiciones acuosas ( $\text{H}_2\text{O}$ /acetonitrilo,  $\text{H}_2\text{O}$ /dimetoxietano), empleando trifenilfosfinas modificadas, como TPPTS o TXPTS.<sup>9,10</sup> Otra alternativa para mejorar la solubilidad es proteger los grupos hidroxilos del azúcar, con grupos acetilos o con grupos sililos.<sup>11,12</sup> En cuanto a la naturaleza del halógeno en el nucleósido, lo habitual es emplear 8-bromonucleósidos, ya que los cloro derivados son menos reactivos y los 8-iodo nucleósidos son difíciles de preparar debido a su inestabilidad. La gran mayoría de ejemplos descritos se refieren a derivados de adenosina, transcurriendo la reacción en muchos casos a temperatura ambiente. Sin embargo, los derivados de guanosina suelen necesitar altas temperaturas. Esta diferencia en la reactividad del nucleósido de partida en las reacciones de acoplamiento se ha atribuido a la complejación de los derivados de guanosina con el catalizador,<sup>9</sup> además de diferencias de solubilidad.

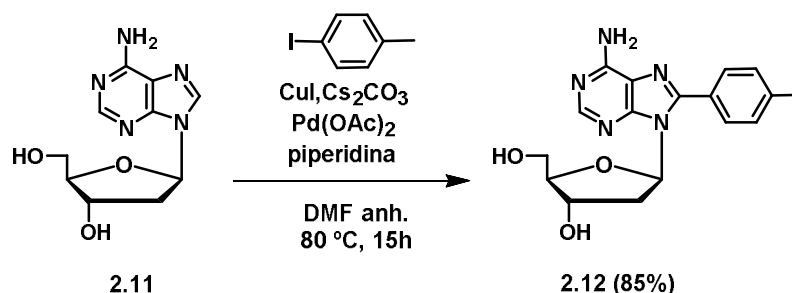
A partir del año 2006 se han descrito reacciones de arilación directa en la posición 8 de nucleósidos de purinas catalizadas por complejos de Pd/Cu empleando halogenuros de arilo. Este procedimiento permite la funcionalización directa y selectiva de dicha posición sin necesidad de prefuncionalizar el nucleósido. El grupo de Hocek fue el primero en aplicar esta metodología a purinas<sup>13,14</sup> y al nucleósido adenosina.<sup>15</sup> Así, la reacción de adenosina con un yoduro de arilo como el 4-iodotolueno, empleando diacetato de paladio como catalizador, yoduro de cobre para activar el enlace C-H y

piperidina como base en *N,N*-dimetilformamida anhidra a 150 °C conduce al producto 8-sustituido **2.9** (68%) y una pequeña cantidad del producto **2.10**, disustituido en C-8 y en N-6 (Esquema 2.4). El empleo de otras bases como Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> también conduce a buenos rendimientos. Sin embargo, estas condiciones de reacción no se pueden aplicar cuando el nucleósido es 2'-desoxiadenosina ya que se observa descomposición.



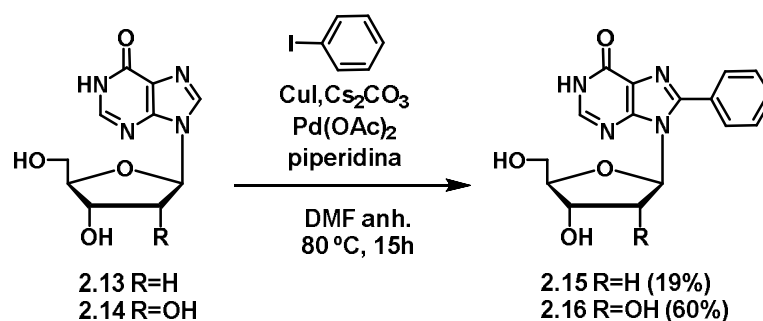
Esquema 2.4

Casi en paralelo, el grupo de Fairlamb<sup>16,17</sup> llevó a cabo un estudio detallado de esta reacción con la idea de emplear condiciones de reacción menos enérgicas que permitieran aumentar los rendimientos, mejorar la regioselectividad de la reacción y extenderla a 2'-desoxinucleósidos. Los mejores resultados se obtuvieron empleando una mezcla de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y piperidina, y proponen que ésta última mejora la eficacia del precatalizador. En estas condiciones, empleando 4-iodotolueno y calentando a 80 °C, como se refleja en el esquema 2.5, se pudo obtener la 2'-desoxiadenosina 8-arylada **2.12** con un 85% de rendimiento y sin que se detectara el compuesto de arilación en N-6.



Esquema 2.5

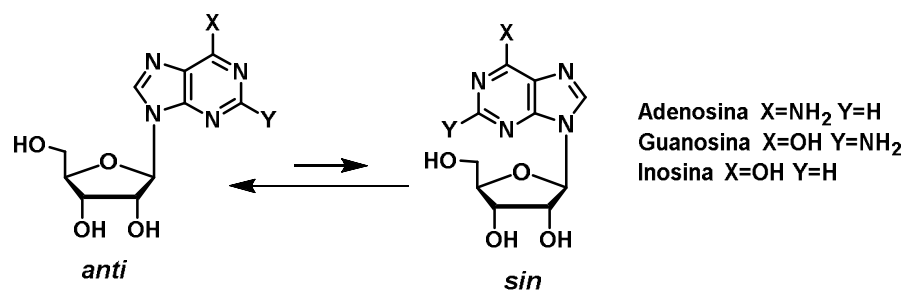
Estas condiciones se han aplicado a nucleósidos de adenosina,<sup>16,17</sup> en menor medida de guanosina y solo existe un ejemplo de inosina como se muestra en el esquema 2.6.<sup>17</sup> En este caso, y tras 15 horas, la reacción transcurre con buen rendimiento para la inosina **2.14**, pero no así para la 2'-desoxiinosina **2.13**.



Esquema 2.6

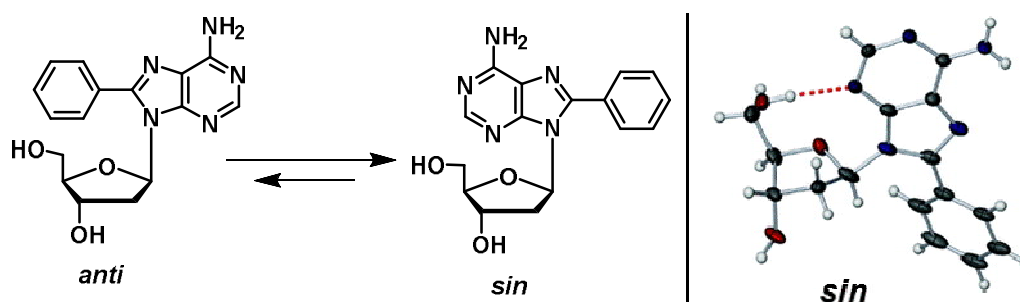
Una vez descritos los métodos de síntesis de los nucleósidos 8-arilados, se comentarán brevemente sus propiedades conformacionales y los estudios más significativos de los que han sido objeto, relacionados con sus propiedades fluorescentes, aspectos toxicológicos y potencial terapéutico.

En general, los nucleósidos presentan un equilibrio conformacional *sin/anti* según la disposición relativa de la base respecto al azúcar. En nucleósidos de purina se considera que la conformación es *sin* cuando el N-3 de la base se encuentra sobre el azúcar, y *anti*, cuando la orientación es la opuesta. En nucleósidos naturales de purina la conformación *anti* es la más favorecida, como se muestra en el esquema 2.7.



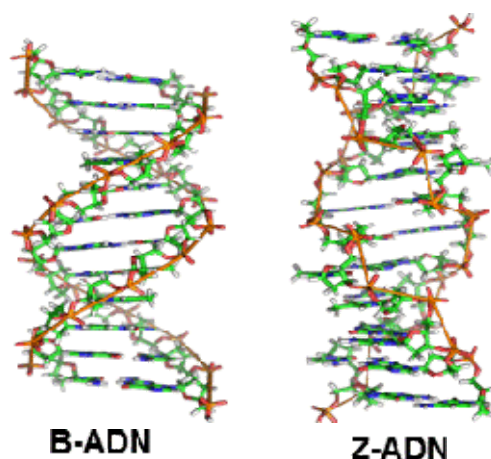
Esquema 2.7

Sin embargo, estudios de modelado molecular, RMN y rayos X han demostrado que los nucleósidos con grupos arilo en la posición 8 presentan preferentemente la conformación *sin* en torno al enlace glicosídico debido al impedimento estérico que se genera entre el grupo arilo y el hidroxilo de la posición 5' del azúcar.<sup>18,19</sup> Además, los estudios de rayos X ponen de manifiesto la formación de un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo 5' del azúcar y el N-3 de la base (Figura 2.2).



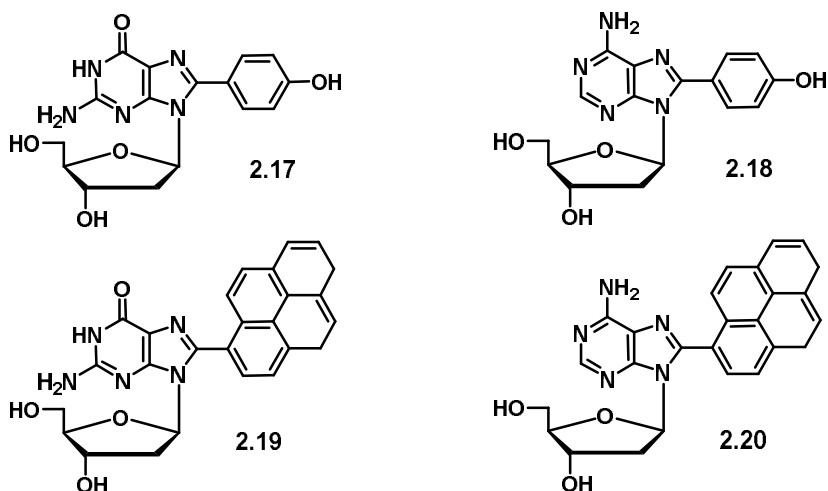
**Figura 2.2.** Equilibrio conformacional de 8-fenil-2'-desoxiadenosina y rayos X <sup>17</sup>

También se ha estudiado el comportamiento de los nucleósidos 8-arilados cuando forman parte de oligonucleótidos. Así, con los 8-aril-2'-desoxinucleósidos se ha observado un comportamiento diferente al de los nucleósidos no sustituidos, de modo que el equilibrio B/Z de la doble hélice de ADN se encuentra desplazado hacia la forma Z (Figura 2.3).<sup>20</sup>



**Figura 2.3**

Otro campo de estudio de los nucleósidos 8-arilados está relacionado con aspectos toxicológicos. Se ha descrito que la exposición del ADN a arilhidracinas,<sup>4</sup> toxinas de naturaleza fenólica<sup>21,22</sup> o hidrocarburos policíclicos aromáticos,<sup>23</sup> puede conducir a aductos de nucleósidos de purina sustituidos en la posición 8. En algunos casos se ha correlacionado el potencial carcinogénico de estas sustancias con su capacidad de formar estos aductos.<sup>4,21-23</sup> Estos nucleósidos 8-arilados como los derivados de fenol **2.17** y **2.18**<sup>24</sup> y los derivados de hidrocarburos policíclicos aromáticos **2.19** y **2.20**<sup>25</sup> tienen propiedades fluorescentes (Esquema 2.8). Por ello, algunos autores han propuesto que estos nucleósidos podrían servir como marcadores de lesiones en el ADN.



Esquema 2.8

Por otro lado, las propiedades fluorescentes de los nucleósidos 8-arilados<sup>26,27</sup> han sido aprovechadas para el diseño de sondas biomoleculares.<sup>28,29</sup> A modo de ejemplo, Collier y col. han sintetizado 8-aril guanosinas difosfato (8-aril-GDP) y han propuesto su uso como sondas moleculares para explorar mecanismos bioquímicos asociados a manosiltransferasas dependientes de GDP (II en la figura 2.4).<sup>30</sup> Igualmente se han preparado 8-aril guanosinas monofosfato (I, 8-aril-GMP)<sup>31</sup> o trifosfato (III, 8-aril-GTP)<sup>32</sup> para explorar mecanismos bioquímicos que involucran al GMP y al GTP, respectivamente.

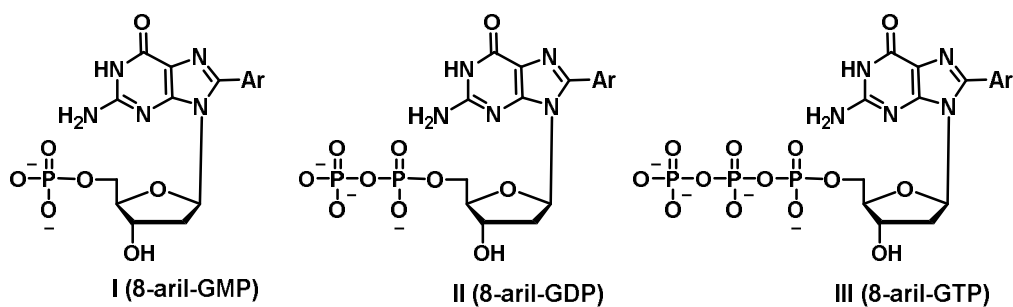


Figura 2.4

De lo comentado hasta el momento se puede concluir que la síntesis de nucleósidos de 8-aril purinas ha experimentado un importante desarrollo en los últimos años, fundamentalmente gracias a las reacciones de acoplamiento C-C. Estos compuestos tienen propiedades interesantes desde el punto de vista conformacional, toxicológico o como sondas biomoleculares, habiéndose estudiado fundamentalmente derivados 8-arilados de adenosina y guanosina. Sin embargo los derivados 8-arilados de inosina prácticamente no han sido explorados. Si bien la inosina o la 2'-desoxiinosina no son

componentes abundantes en el ADN o ARN, su presencia en el organismo no es inusual debido a la acción de la adenosina desaminasa.<sup>33,34</sup> Es más, recientemente se ha descrito que los porcentajes de inosina en el ARN se pueden ver incrementados como consecuencia de infecciones virales y podrían constituir un nuevo elemento de reconocimiento de respuesta inmunitaria.<sup>35</sup> En la bibliografía se encuentran también descritos derivados de inosina con actividad antiviral<sup>36,37</sup> y anticancerosa.<sup>38-41</sup> Igualmente la inosina es el sustrato natural de la enzima fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP, de sus siglas en inglés *Purine Nucleoside Phosphorylase*). Esta enzima cataliza la fosforólisis de nucleósidos de 6-oxopurina (inosina y guanosina) como se muestra en la figura 2.5.<sup>42</sup>

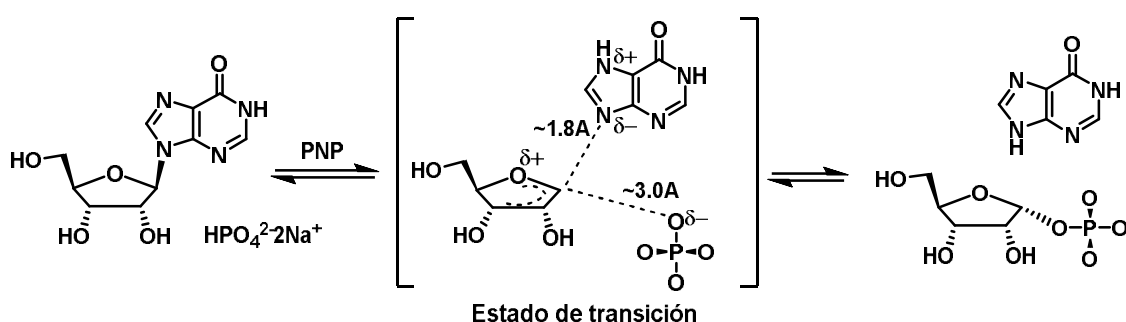


Figura 2.5

Esta enzima tiene un papel crucial en la síntesis de nucleósidos de purina, especialmente en la replicación de distintos patógenos. Por ello, ha sido considerada una diana terapéutica de interés en la quimioterapia antiinfecciosa.



## 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el interés que presentan los nucleósidos 8-arilados, como se ha comentado en la introducción, el principal objetivo de este capítulo ha sido la síntesis de inosinas 8-sustituidas mediante la reacción de arilación directa tomando como base los buenos resultados inicialmente descritos en adenosina por Hocek<sup>15</sup> y posteriormente por Fairlamb.<sup>17</sup> Conforme a estos precedentes, debería ser posible la incorporación de anillos aromáticos sustituidos tanto con grupos electrodonadores como electroaceptores. Así, se propone en este capítulo la síntesis de distintas inosinas 8-sustituidas con grupos arilo (Figura 2.6).

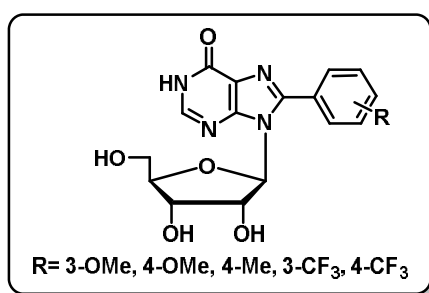


Figura 2.6

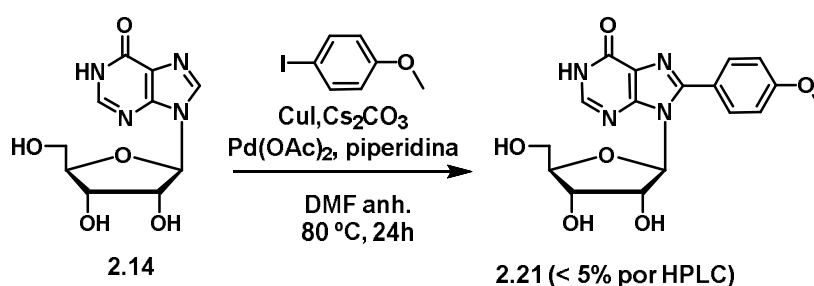
Los compuestos sintetizados se ensayarán en cultivo celular como potenciales agentes antivirales y anticancerosos. Además, al tratarse de 6-oxonucleósidos, serán también evaluados frente a enzimas con capacidad fosforilasa de nucleósidos de purina. Por último, se medirán las propiedades de fluorescencia de algunos de estos compuestos.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Síntesis

Basados en los antecedentes comentados anteriormente aplicados a nucleósidos de adenosina, nuestra primera aproximación para la síntesis de las estructuras propuestas en los objetivos consistió en la arilación directa en C-8 de la inosina. Para ello, y haciendo uso de las condiciones puestas a punto por el grupo de Fairlamb,<sup>17</sup> se hizo reaccionar la inosina **2.14** con 4-iodoanisol a 80 °C en un tubo schlenk durante 24 h en DMF anhidra, tal y como se muestra en el esquema 2.9.



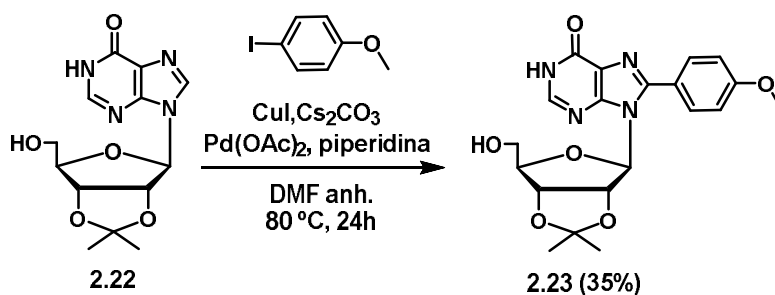
Esquema 2.9

Transcurridas 24 h, la reacción se había solidificado. Este crudo de reacción se intentó procesar buscando su solubilización total o parcial, seguido de filtración, o/y lavados. Para los lavados se emplearon disoluciones de EDTA, HCl 1N o ácido cítrico, y se utilizaron diferentes disolventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt,  $i\text{PrOH}/\text{AcOEt}$ ,  $i\text{BuOH}$ ), para intentar extraer tanto el compuesto de partida (**2.14**) como el producto buscado (**2.21**), pero siempre se obtuvieron mezclas heterogéneas (sólido-líquido) difíciles de analizar. Además, los análisis que se pudieron realizar por HPLC-MS de estas mezclas heterogéneas mostraban una conversión del compuesto **2.14** al producto 8-arilado (**2.21**) muy baja, aproximadamente de un 5%.

En química de nucleósidos está bien establecido que las condiciones de síntesis de derivados de adenosina, que eran la mayoría de ejemplos descritos, no siempre son extrapolables a sus análogos de inosina o guanosina. Entre las razones que se suelen argumentar están la menor solubilidad de estos últimos así como la posible complejación con distintos catalizadores.<sup>9</sup> Estos factores podrían ayudar a explicar los problemas encontrados y la baja conversión. Puesto que los estudios de Fairlamb habían analizado con suficiente detalle la idoneidad de los catalizadores y de las aminas secundarias como aditivo,<sup>17</sup> nuestros esfuerzos se centraron en la mejora de la

solubilidad. Por ello, se utilizaron otros disolventes como NMP y DMSO. Sin embargo, esto no ayudó a mejorar la conversión a la inosina 8-arilada **2.21**.

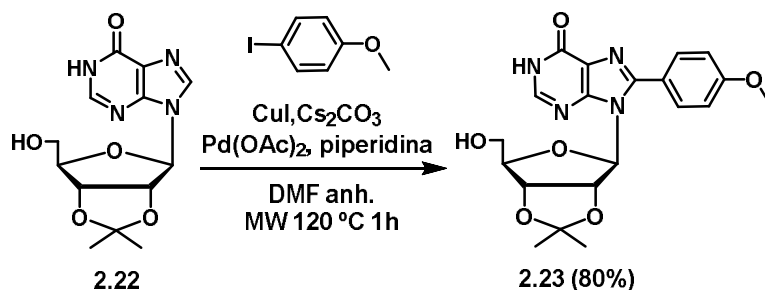
Otra alternativa para mejorar la solubilidad es la incorporación de grupos protectores. De este modo, se llevaría a cabo la reacción de arilación directa en la inosina protegida y posteriormente se eliminaría el grupo protector. Se consideró que la 2',3'-O-isopropilideninosina (**2.22**) podría constituir un buen producto de partida, ya que este grupo protector es resistente a las condiciones básicas que requería la reacción. Así, el nucleósido comercial 2',3'-O-isopropilideninosina (**2.22**) se trató con 4-iodoanisol, CuI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, piperidina y Pd(OAc)<sub>2</sub> a 80 °C en un tubo schlenk durante 24 h en DMF anhidra, obteniéndose el compuesto 8-arilado protegido (**2.23**) con un rendimiento aparente del 35% (Esquema 2.10).



Esquema 2.10

En este caso, el procesamiento de la reacción consistió en la dilución en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1), seguido de filtración para eliminar una parte de las sales y posterior cromatografía, ya que el empleo de lavados ácidos utilizados por otros autores conducía a la ruptura del enlace glicosídico. Para intentar mejorar este rendimiento se incrementaron los tiempos de reacción (24, 48 y 72 h) así como la temperatura (80, 100 y 120 °C). A pesar de las dificultades para cuantificar los resultados, el incremento de temperatura conducía a una mayor conversión en el producto arilado. Además, para acortar el tiempo de reacción (24h), se realizaron ensayos empleando calefacción con microondas. Existían precedentes satisfactorios del empleo de microondas para la arilación de bases púricas a 160 °C,<sup>43</sup> sin embargo Fairlamb había descrito que el empleo de estas condiciones a la 2'-desoxiadenosina conducía a la ruptura del enlace glicosídico.<sup>16</sup> En nuestro caso consideramos que la 2',3'-O-isopropilideninosina, al ser un ribonucleósido, era bastante más robusta que la 2'-desoxiadenosina.

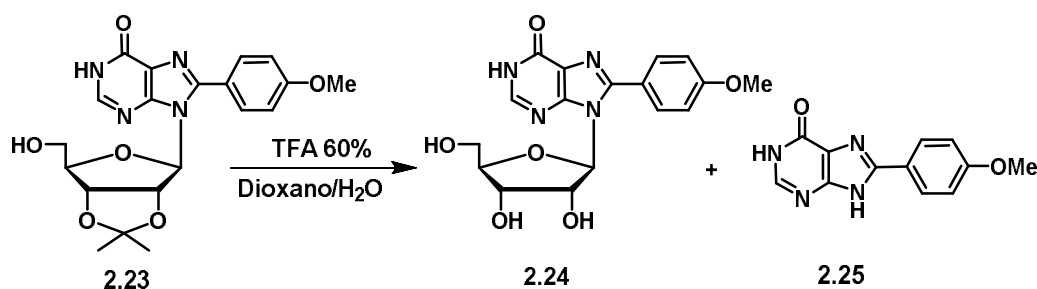
Afortunadamente, la reacción de **2.22** con 4-iodoanisol en presencia de CuI, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub> y piperidina, por irradiación en microondas a 120 °C durante 1 h condujo al producto de arilación **2.23** con un rendimiento aparente del 80% (Esquema 2.11).



Esquema 2.11

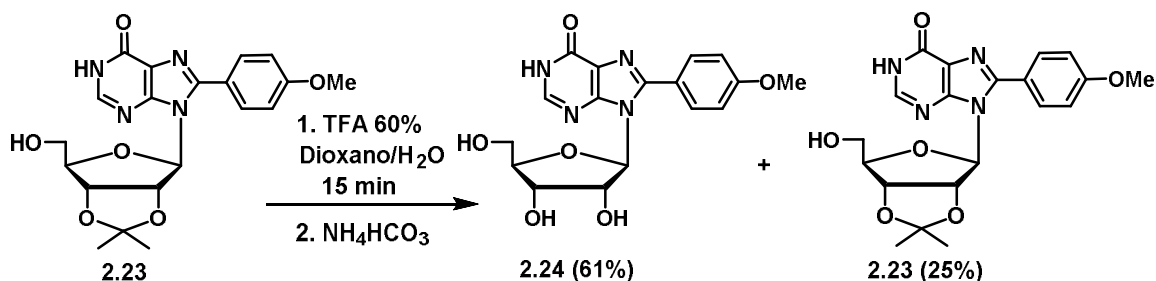
Se habla de rendimiento aparente porque a pesar de que el procesado incluía filtración y cromatografía, el producto aislado estaba muy coloreado, lo que parecía sugerir contaminación con sales metálicas. Puesto que nuestro objetivo principal consistía en el ensayo de las propiedades biológicas de estos nuevos nucleósidos, y debido a que la contaminación con sales metálicas puede llevar a una errónea lectura de los datos biológicos,<sup>44-46</sup> era necesario obtener estos compuestos libres de metales. Para ello, se consideró el tratamiento con QuadraSil<sup>®</sup> MP, una resina funcionalizada con grupos mercaptopropilo empleada para captar sales de Cu y Pd. Así, el tratamiento del producto coloreado obtenido de la purificación cromatográfica con QuadraSil<sup>®</sup> MP en DMF durante la noche y posterior filtración, condujo a un sólido blanco que se identificó como el nucleósido **2.23** y que se aisló con un rendimiento del 52%. Por tanto, se puede concluir que los lavados y la posterior purificación cromatográfica no fueron suficientes para la eliminación de contaminantes metálicos, eliminación que se puede conseguir mediante tratamiento con Quadrasil<sup>®</sup> MP.

Para la desprotección del grupo isopropilideno, el compuesto **2.23** se trató con TFA al 60% en una mezcla dioxano/H<sub>2</sub>O (1:1). Sin embargo, en estas condiciones se observó que además del producto de desprotección **2.24**, se formaba la base arilada **2.25**, resultante de la ruptura del enlace glicosídico (Esquema 2.12).



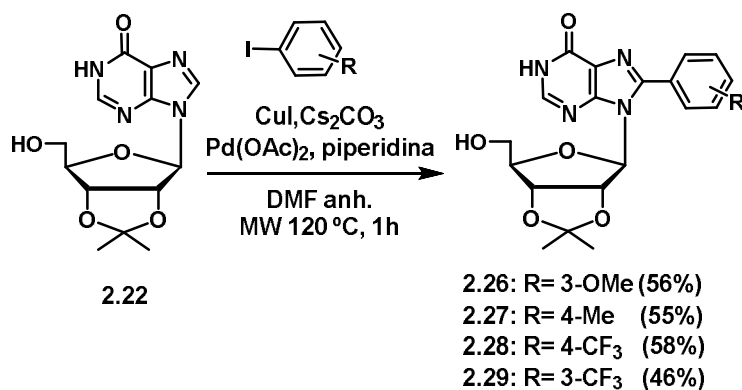
Esquema 2.12

Para minimizar la formación de la base nitrogenada **2.25**, se neutralizó la reacción a los 15 min con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. De esta manera se recuperaba parte del producto de partida, que podría ser reutilizado, y se evitaba la formación de la base **2.25**, que dificultaba la purificación. (Esquema 2.13).



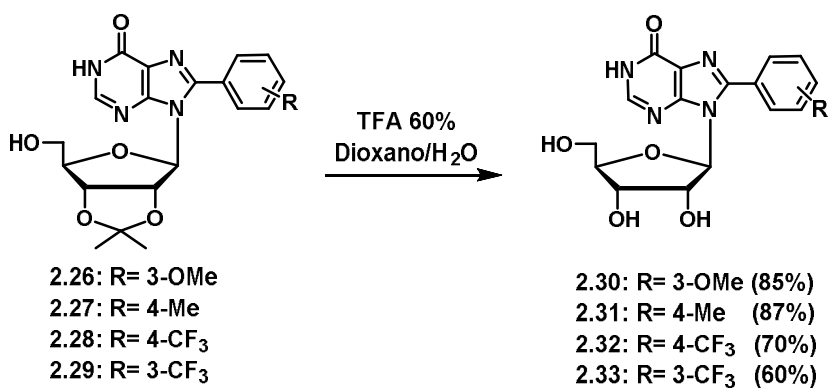
Esquema 2.13

Una vez solventados los problemas de purificación del producto resultante de la reacción de arilación y establecidas las condiciones para la reacción de desprotección, procedimos a aplicar esta secuencia de reacción a otros halogenuros de arilo portadores de sustituyentes electrodadores o electroattractores en las posiciones *meta* y *para*. Así, se hizo reaccionar la 2',3'-O-isopropilideninosina (**2.22**) con el 3-iodoanisol, 4-iodotolueno y los ioduros de 4 y 3-trifluorometilfenilo en DMF anhidra por calentamiento al microondas a 120 °C durante 1h (Esquema 2.14). Los compuestos obtenidos de la purificación cromatográfica se trataron con la resina QuadraSil<sup>®</sup> MP. Así se obtuvieron los productos **2.26-2.29**, con rendimientos del 46 al 58%. Los rendimientos de los productos aislados apuntan a que la reacción transcurre con conversiones similares independientemente de la naturaleza o posición de los sustituyentes, como ya se había descrito para la adenosina.<sup>17</sup>



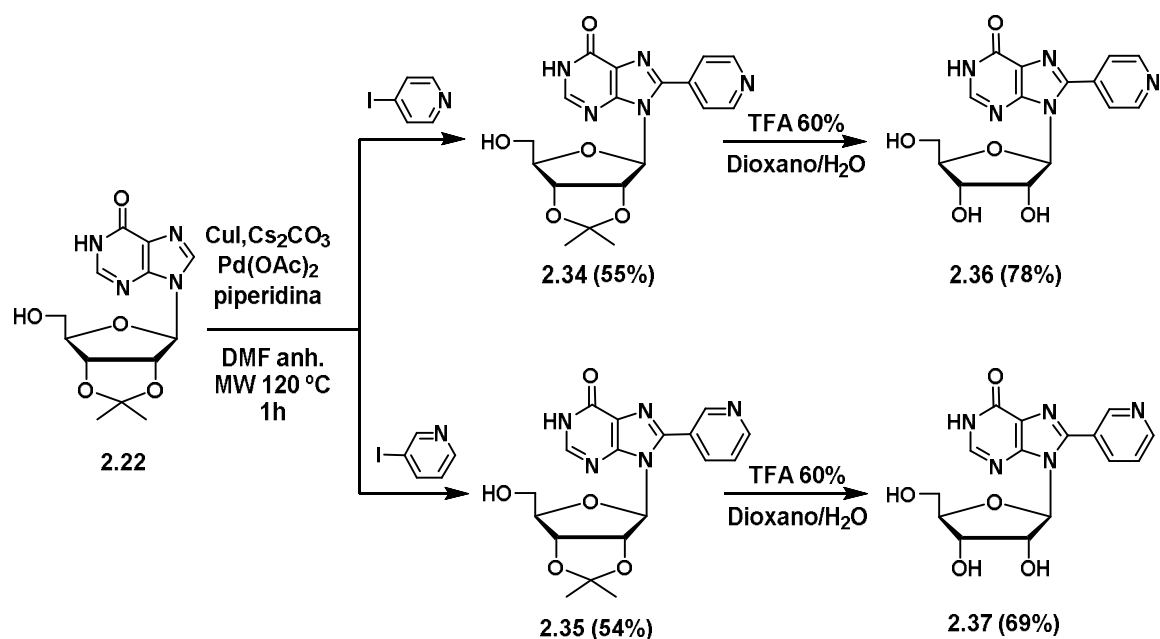
Esquema 2.14

Posteriormente, la desprotección del grupo isopropilideno en los compuestos **2.26-2.29** mediante tratamiento con TFA al 60% en una mezcla de dioxano: H<sub>2</sub>O y controlando el tiempo de reacción condujo a las inosinas 8-sustituidas **2.30-2.33** con buenos rendimientos (Esquema 2.15).



Esquema 2.15

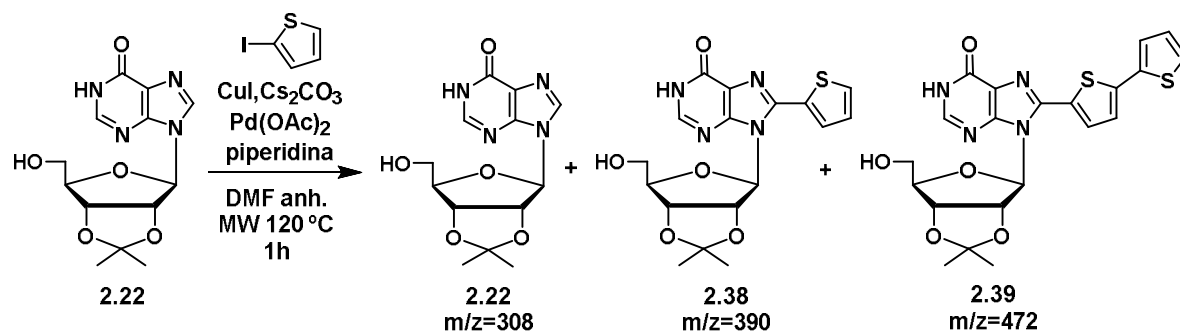
Obtenidos los compuestos inicialmente propuestos, se consideró de interés aplicar la reacción de arilación para incorporar heterociclos en la posición 8 de la inosina, en concreto la 3- y la 4-piridina así como el 2-tiofeno.



Esquema 2.16

Así, la reacción de arilación directa de la 2',3'-O-isopropilideninosina (**2.22**) con la 4-iodo y 3-iodopiridina (Esquema 2.16), en presencia de  $\text{CuI}$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , piperidina y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  en DMF anhidra por calentamiento al microondas a  $120^\circ\text{C}$  durante 1 h, condujo a los productos de acoplamiento **2.34** y **2.35** que se obtuvieron, tras la correspondiente purificación, con rendimientos del 55 y del 54%, respectivamente. A continuación, la desprotección del grupo isopropilideno con TFA al 60% dio lugar a la 8-(4-piridil)inosina (**2.36**) y 8-(3-piridil)inosina (**2.37**) con buenos rendimientos.

En paralelo, se hizo reaccionar el compuesto **2.22** con el 2-iodotiofeno, en presencia de  $\text{CuI}$ ,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , piperidina y  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  en DMF anhidra calentando al microondas a  $120^\circ\text{C}$  durante 1 h. En este caso se obtuvo una mezcla de productos (Esquema 2.17).



Esquema 2.17

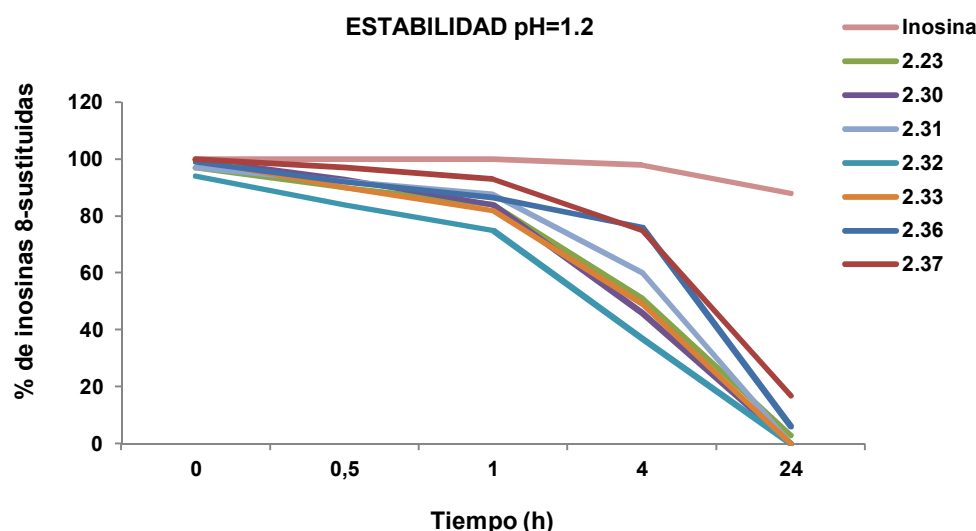


El análisis por HPLC-MS indicó la presencia del producto de partida (**2.22**), un producto con  $m/z$  390 que podría corresponder al producto deseado **2.38** y un tercer compuesto, de  $m/z$  472 que podría corresponder a un compuesto que presentaba dos unidades de tiofeno (**2.39**). Los compuestos **2.38** y **2.39** presentaban movilidades cromatográficas muy similares por lo que no fue posible su separación. El espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la mezcla permitió confirmar que el compuesto **2.38** era el compuesto de acoplamiento deseado mientras que el producto con mayor masa molecular, **2.39**, correspondía al compuesto resultante del homoacoplamiento del heterociclo. Esta reacción no deseada ya había sido descrita por otros autores.<sup>47</sup>

### 3.2. Estudios de estabilidad

Durante la síntesis, tanto en los lavados como en la etapa de desprotección, se había observado una cierta labilidad del enlace glicosídico para estos nucleósidos 8-arilados en condiciones ácidas. Antes de realizar los ensayos biológicos de estos compuestos, se decidió estudiar su estabilidad a diferentes pHs (1.2, 5.0 y 7.4) mediante incubación a 37 °C. Para ello, se prepararon disoluciones de concentraciones finales 50  $\mu\text{M}$  de los compuestos **2.23**, **2.30-2.33**, **2.36** y **2.37** a los tres pHs a partir de disoluciones patrón 5 mM de estos compuestos en DMSO. Con fines comparativos se incluyó en este ensayo la inosina. Para el seguimiento de los estudios de incubación se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0h, 1h, 4h y 24h) que fueron analizadas por HPLC. Esto requirió la puesta a punto de las condiciones cromatográficas para asegurar una diferencia suficiente en tiempos de retención entre el nucleósido y su correspondiente base nitrogenada.

Los resultados obtenidos de la incubación de los compuestos **2.23**, **2.30-2.33**, **2.36** y **2.37** indicaron que tanto a pH 7.4 como a pH 5.0, tras 24h de incubación a 37 °C, los nucleósidos eran perfectamente estables. Solo a pH 1.2 se observó la ruptura del enlace glicosídico y formación de la correspondiente base nitrogenada. En la figura 2.7 se representan los porcentajes de nucleósido intacto a pH=1.2 en función del tiempo de incubación.



**Figura 2.7.** Estabilidad de las inosinas C-8 sustituidas a pH=1.2

Como se puede observar, los nucleósidos 8-sustituídos son más sensibles al pH ácido que la inosina, de modo que tras 24 h de incubación el porcentaje de nucleósido intacto es menor del 20%. La vida media de estos compuestos es de aproximadamente 5 horas exceptuando las 8-piridilinosinas que muestran una mayor estabilidad, con vidas medias entre 10 y 15 horas. Por tanto, cabría concluir que los sustituyentes introducidos en la posición 8 conducen a un aumento en la labilidad del enlace glicosídico en condiciones ácidas respecto a la inosina.

### 3.3. Evaluación biológica

Una vez determinada la estabilidad de estos compuestos (**2.23**, **2.30-2.33**, **2.36** y **2.37**) se evaluó su actividad antiviral en cultivo celular frente a diferentes virus ADN y ARN tales como el herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2, citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana, virus influenza, parainfluenza 3, Coxsackie, Sindbis, Punta Toro, virus vacuna y virus de la estomatitis vesicular, estudios realizados en el Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica). Desafortunadamente no se detectó actividad antiviral significativa con ninguno de los compuestos. El compuesto **2.31** no pudo ser evaluado debido a su baja solubilidad. Conviene resaltar que en ningún caso se detectó citotoxicidad en las distintas líneas de células hospedadoras (CEM, HEL, HeLa, Vero y MDCK) a 100  $\mu$ M, lo que apoya la ausencia de contaminantes tóxicos en los compuestos ensayados.

Los compuestos **2.23**, **2.30**, **2.32**, **2.33**, **2.36** y **2.37** fueron ensayados frente a la enzima purina nucleosido fosforilasa del *Plasmodium falciparum* (PfPNP). Esta enzima,

cuyo sustrato natural es la inosina, provoca la ruptura del enlace glicosídico liberando la base púrica (hipoxantina) y la ribosa-1-fosfato (Figura 2.8).<sup>48</sup> La *Pf*PNP pertenece a la vía de recuperación de nucleósidos de purina y tiene un papel crucial en la supervivencia del parásito. La inhibición de *Pf*PNP bloquea la conversión de inosina a hipoxantina generándose una disminución drástica en los niveles de purina que provocan una inhibición en la proliferación del parásito. Por ello, la *Pf*PNP se ha propuesto como una diana terapéutica para combatir la malaria.<sup>49</sup>

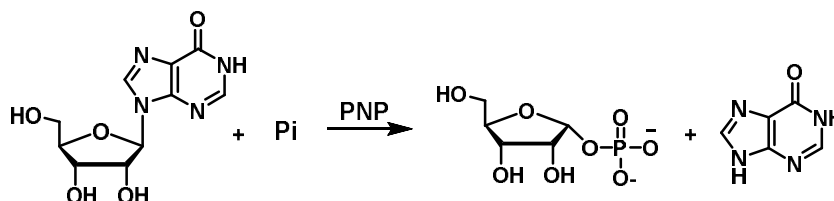
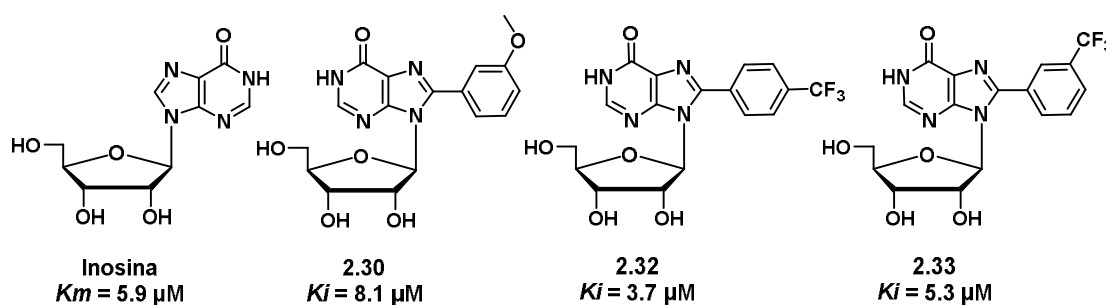


Figura 2.8

Cuando los compuestos se evaluaron en un ensayo fotométrico frente a la fosforólisis de inosina catalizada por *Pf*PNP, ensayos realizados por el grupo de la Dra. González Pacanowska del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN-CSIC) en Granada, se observó actividad inhibitoria significativa con los compuestos **2.30**, **2.32** y **2.33** con valores de  $K_i$  de 8.1, 3.7 y 5.3  $\mu\text{M}$ , respectivamente; en todos los casos valores comparables al valor de la  $K_m$  del sustrato natural inosina ( $K_m = 5.9 \mu\text{M}$ ).

Figura 2.9. Valores de  $K_i$  y  $K_m$  frente a *Pf*PNP

Estos compuestos también se ensayaron frente a la PNP de otros organismos, en concreto frente a la enzima humana, y las enzimas procariotas de *E. coli* y *Mycoplasma hyorhins*, en el Instituto Rega. Frente a estas tres enzimas no se observó inhibición significativa a concentraciones de 250  $\mu\text{M}$ . Por tanto se puede concluir que las 8-arilinosinas **2.30**, **2.32** y **2.33** muestran una inhibición selectiva frente a la enzima PNP de *Plasmodium falciparum* (Figura 2.9). Además el compuesto **2.32**, cuando se ensayó

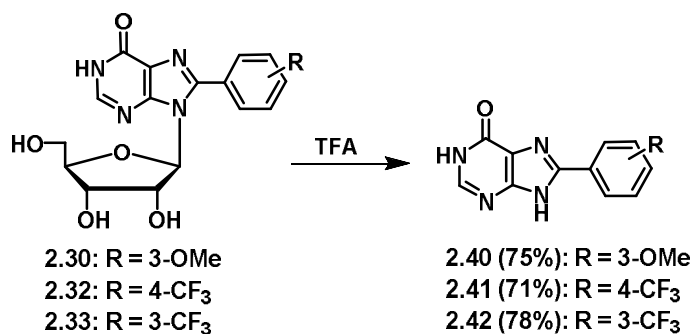
frente al crecimiento de *Plasmodium falciparum* en cultivo, mostró una inhibición del crecimiento del parásito del 98% a una concentración de 40 µg/mL. Este dato, junto a la falta de citotoxicidad frente a células humanas, constituye un dato prometedor ya que las inosinas 8-sustituidas no habían sido descritas con anterioridad como antimaláricos.

### 3.4. Medida de fluorescencia

Como se ha comentado en la introducción, los nucleósidos de purina 8-sustituidos suelen presentar propiedades fluorescentes.<sup>28</sup> Estas propiedades resultan útiles para el empleo de nucleósidos como sondas biomoleculares o como meras herramientas bioquímicas en el estudio y regulación de enzimas.<sup>30,50</sup>

A la luz de los resultados obtenidos en la inhibición de enzima *Pf*PNP, se consideró emplear esta propiedad para estudiar el comportamiento de los compuestos **2.30**, **2.32** y **2.33**, en presencia y en ausencia de la enzima *Pf*PNP. Como se ha comentado en el apartado anterior, la enzima *Pf*PNP rompe el enlace glicosídico de la inosina liberando la base nitrogenada, hipoxantina. Si los compuestos **2.30**, **2.32** y **2.33** actuaran como sustrato, al ponerlos en contacto con la enzima *Pf*PNP se rompería el enlace glicosídico liberándose las bases nitrogenadas 8-ariladas. Por tanto, los cambios en la fluorescencia de los compuestos al incubarlos con la enzima podrían ser indicativos de su reconocimiento como sustratos. Además, como los compuestos no son reconocidos por otras PNP (humana, *E coli*, etc...) los cambios en fluorescencia en cultivo podrían ser indicativos de la presencia de *Pf*PNP y podría explorarse la potencial aplicabilidad de los compuestos como sonda biomolecular.

Antes de llevar a cabo los estudios de incubación con la enzima, era necesario determinar las propiedades fluorescentes de los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33**, así como las de sus correspondientes bases nitrogenadas. Para obtener estas bases, los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33** se trataron con una disolución acuosa de TFA (pH=1.2) a 37 °C obteniéndose los compuestos **2.40**, **2.41** y **2.42** con buenos rendimientos (Esquema 2.18).



Esquema 2.18

Una vez sintetizados los compuestos, se prepararon disoluciones de los mismos (**2.30**, **2.32**, **2.33**, **2.40-2.42**) a concentraciones 50  $\mu$ M en PBS partiendo de una disolución patrón de concentración 5 mM en DMSO y se registraron los espectros de emisión (em) y excitación (ex) para cada par nucleósido/base nitrogenada.

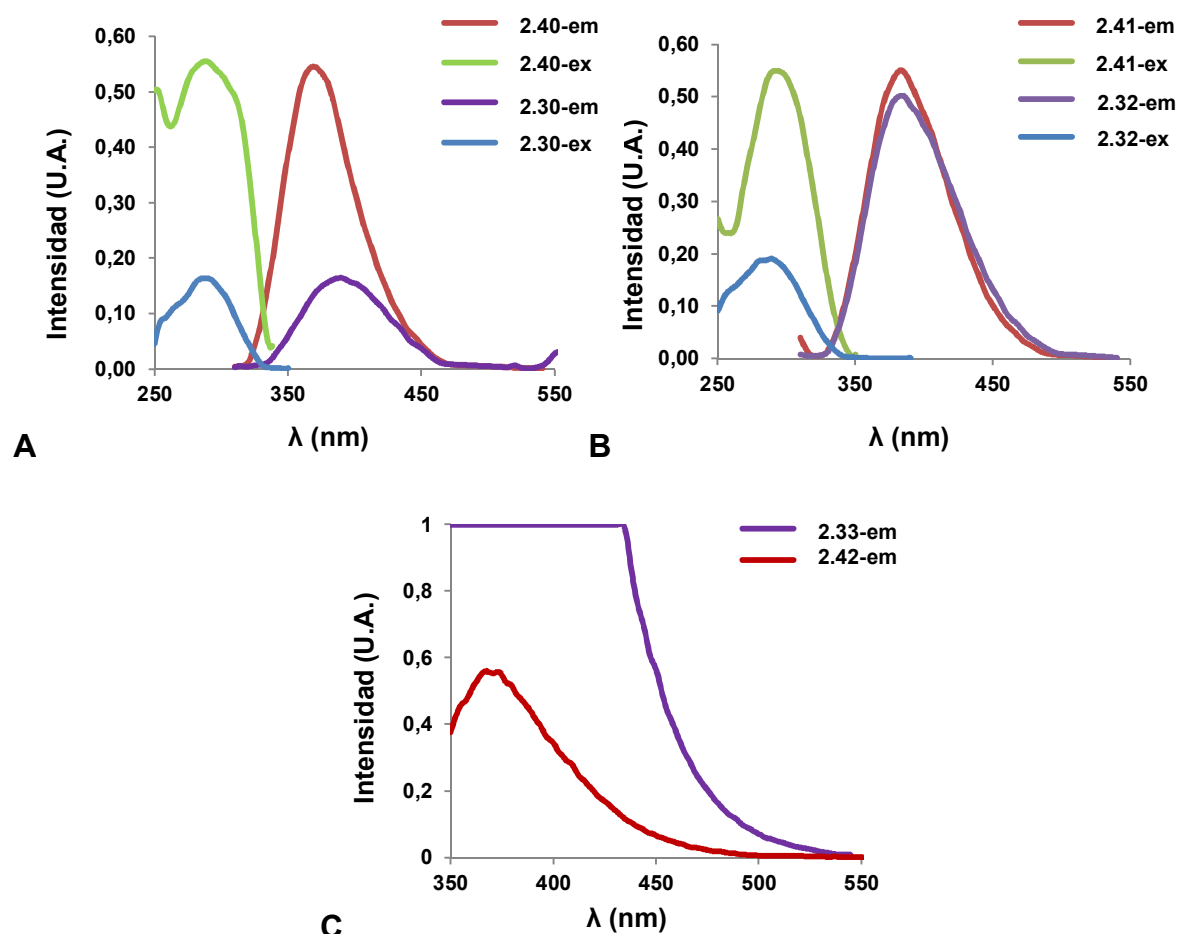


Figura 2.10

En la figura 2.10A, correspondiente al nucleósido **2.30** y su base **2.40**, se observa que la base nitrogenada **2.40** presenta una intensidad de fluorescencia tres veces

superior a la del correspondiente nucleósido **2.30**. Por su parte, el nucleósido **2.32** y su base **2.41**, representados en la figura 2.10B, presentan intensidades similares. Por último, para el par **2.33/2.42**, de las que sólo se representan los espectros de emisión (Figura 2.10C), y utilizando las mismas condiciones con fines comparativos, la base **2.42** tiene valores de intensidad similares a las bases anteriores, mientras que la fluorescencia del nucleósido es significativamente mayor y excede la escala empleada.

Retomando la hipótesis de trabajo, el par **2.30/2.40** parecía el más adecuado para nuestros intereses ya que si el nucleósido fuera reconocido como sustrato podría esperarse un incremento de fluorescencia, escenario que no sería posible con los nucleósidos **2.32** ó **2.33**. De este modo, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia del compuesto **2.30** en presencia de *PfPNP* en placas multipocillo. Se midió la fluorescencia a diferentes longitudes de onda de emisión con la longitud de excitación fija a 288 nm. Se registraron los espectros tras 30 min y 2h de incubación (Figura 2.11). Como controles se incluyeron tampón fosfato (en azul), el nucleósido (en verde), y la base nitrogenada **2.40** (en rojo), mientras que la incubación del compuesto con *PfPNP* se representa en líneas discontinuas moradas.

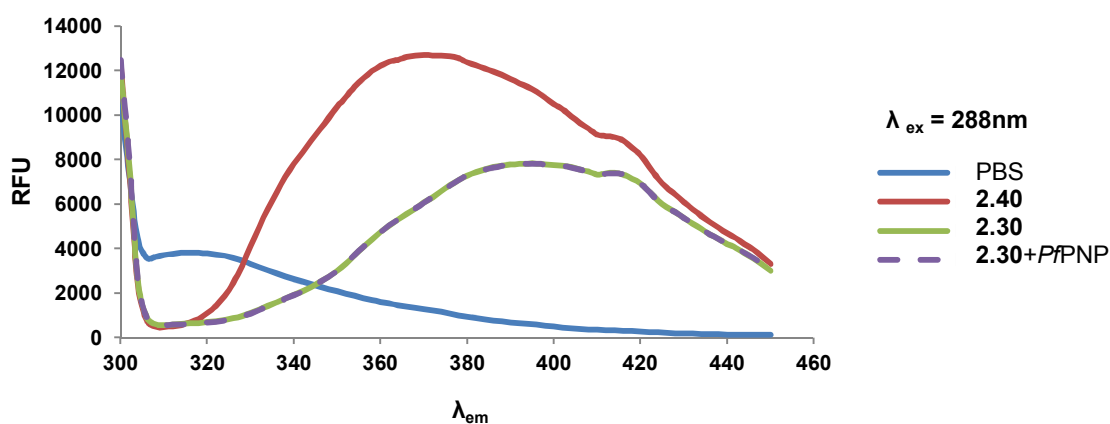


Figura 2.11

La lectura de los controles representados en la Figura 2.11 está en consonancia con las medidas de fluorescencia realizadas con anterioridad, de modo que la base nitrogenada (en rojo) presenta mayor intensidad de fluorescencia que el nucleósido (en verde). Ahora bien, la presencia de la enzima *PfPNP* no altera la fluorescencia del nucleósido ni a 30 min ni tras 2h. Esto parece indicar que la presencia de la enzima no conduce a la formación de la base posiblemente porque el nucleósido no es sustrato de

la enzima. Estos datos limitan la aplicabilidad de **2.30** como potencial sonda o herramienta bioquímica en relación con esta enzima.

Una vez puesta a punto la secuencia de síntesis y las condiciones de purificación, así como establecido que la enzima PNP de *Plasmodium falciparum* puede ser inhibida de un modo selectivos por inosinas 8-ariladas, podría ser posible incorporar en la posición 8 de la inosina otros grupos aromáticos y evaluar su potencial como inhibidores enzimáticos de la PNP de *Plasmodium*.





## 4. CONCLUSIONES

En este capítulo se han sintetizado una serie de 8-aril y 8-piridil inosinas a partir de la 2',3'-O-isopropilideninosina mediante reacción de arilación directa con yoduros de arilo o piridilo catalizada por Pd/Cu. El empleo de la calefacción por microondas ha permitido una reducción muy significativa de los tiempos de reacción. La obtención de estos compuestos con la pureza requerida para su evaluación biológica ha sido posible gracias al empleo de la resina Quadrasil® MP.

Los estudios de estabilidad realizados a diferentes pHs muestran que las 8-aril o 8-piridil inosinas son perfectamente estables a pHs 7.4 y 5.0, mientras que su vida media a pH=1.2 es de aproximadamente 5 horas para las 8-arilinosinas y de 10 horas para las 8-piridilinosinas.

Los compuestos sintetizados no han presentado actividad antiviral ni citotoxicidad a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33** han mostrado una inhibición moderada frente a la enzima purina nucleósido fosforilasa del *Plasmodium falciparum* (Figura 2.12). Esta inhibición enzimática es además selectiva ya que no se ha observado inhibición de otras PNP (humana, *E. coli* y *Mycoplasma hyorhins*).

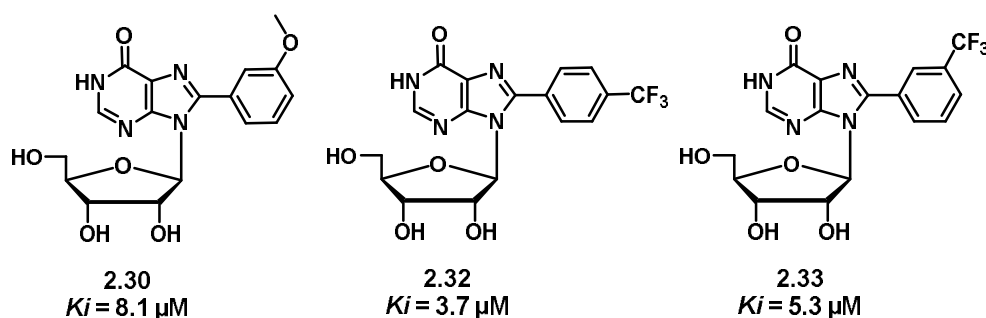


Figura 2.12

Por último, se han medido las propiedades fluorescentes de los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33** y sus correspondientes bases nitrogenadas. Mientras que las bases presentan unas intensidades de emisión comparables, los nucleósidos presentan un comportamiento variable.



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Métodos generales

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F<sub>254</sub> (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm y se visualizaron con luz ultravioleta (254 nm), mediante pulverización con disolución de ninhidrina en etanol al 2% o con disolución de ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. Este seguimiento también se ha llevado a cabo por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras. La piperidina se secó con tamiz molecular 4 Å activado previamente en la estufa. La *N,N*-dimetilformamida anhidra se obtuvo de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo Emrys<sup>TM</sup> Synthesizer (Biotage AB).

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por: a) cromatografía centrífuga circular en capa fina (CCTLC) en Cromatotrón<sup>®</sup> (gel de sílice 60 PF<sub>254</sub> con CaSO<sub>4</sub>) en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min respectivamente, b) cromatografía en cartucho SPE de gel de sílice y cromatografía flash (HPFC) en el Biotage Horizon.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 Hz), Varian UNITY-400 (a 400 y 100 Hz) y Varian 500 (a 500 y 125 Hz), respectivamente. Los espectros monodimensionales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en condiciones estándar. Se ha indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; dd, doble doblete; ddd, doble doble doblete; pt, pseudo- triplete; dt, doble triplete; m, multiplete; ap, aparente; a, ancho), el valor de las constantes de acoplamiento *J* (Hz) y la asignación estructural. Los espectros bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) utilizan la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono

## Parte experimental

(30000 Hz), con un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de HSQC se procesan los datos en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros de masas se han registrado en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100, mediante la técnica de Electro spray.

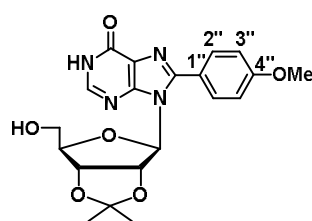
Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo M170 de los productos precipitados.

Los análisis elementales de los compuestos se hallan en el rango de  $\pm 0.5$  respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas usando el espectofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50B del Instituto de Ciencia y tecnología de Polímeros del CSIC.

### 5.2. Síntesis de inosinas 8-sustituidas

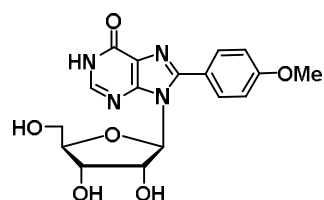
#### 2',3'-O-Isopropiliden-8-(4''-metoxifenil)inosina (**2.23**)



En un vial de microondas se introduce la 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (528 mg, 1.62 mmol) secos, y se añade  $\text{CuI}$  (371 mg, 1.95 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0.03 mmol), el 4-iodoanisol (304 mg, 1.30 mmol) y DMF anhidra (3.2 mL). Se sella el vial y se desoxigena la mezcla. Por último, se adiciona piperidina previamente seca y desoxigenada (26  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol). La mezcla se irradia en el microondas a 120  $^\circ\text{C}$  durante 1 h. Se trata con una mezcla de diclorometano/metanol (2:1, 150 mL), el precipitado que aparece se filtra y el filtrado se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente diclorometano/metanol (10:1). Se obtienen 216 mg de **2.23** como un sólido anaranjado. Este sólido se disuelve en DMF, se trata con Quadrasil<sup>®</sup> MP durante toda la noche, se filtra y se liofiliza. Se obtienen 140 mg de **2.23** como un sólido blanco (52%). **EM** (ES, positivo):  $m/z$  415 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz,

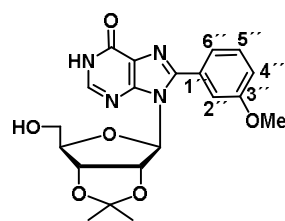
DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.27, 1.44 (s, 6H,  $C(CH_3)_2$ ), 3.57 (m, 2H, H-5'), 3.84 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 4.13 (m, 1H, H-4'), 5.02 (m, 2H, H-3', OH), 5.51 (dd,  $J$  = 5.9, 2.2 Hz, 1H, H-2'), 5.86 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, H-1'), 7.16 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H-3''), 7.65 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-2''), 8.11 (s, 1H, H-2), 12.52 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25.2, 27.1 ( $C(CH_3)_2$ ), 55.4 ( $OCH_3$ ), 61.6 (C-5'), 81.7 (C-3'), 82.4 (C-2'), 87.2 (C-4'), 90.1 (C-1'), 113.2 ( $C(CH_3)_2$ ), 114.4 (C-2''), 121.1 (C-1''), 124.4 (C-5), 130.9 (C-3''), 145.6 (C-2), 148.4 (C-4), 149.6 (C-8), 156.4 (C-6), 160.8 (C-4').

### 8-(4''-Metoxifenil)inosina (2.24)



Se trata **2.23** (100 mg, 0.24 mmol) con una disolución de TFA/ $H_2O$ /dioxano (3:1:1, 2.4 mL) durante 15 min. La reacción se neutraliza con una disolución saturada de  $NH_4HCO_3$ , y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol (10:1 a 5:1). Se obtienen 88 mg (98%) de **2.24** como un sólido blanco. **Pf** 134-137 °C. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  375 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3.53, 3.67 (m, 2H, H-5'), 3.84 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.90 (m, 1H, H-4'), 4.14 (dd,  $J$  = 2.1, 4.8 Hz, 1H, H-3'), 5.10 (t ap,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, H-2'), 5.11 (s a, 2H, OH), 5.47 (s a, 1H, OH), 5.72 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 7.12 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-3''), 7.65 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2''), 8.06 (s, 1H, H-2).  $^{13}C$  RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  56.0 ( $OCH_3$ ), 62.8 (C-5'), 71.5 (C-3'), 71.9 (C-2'), 87.0 (C-4'), 89.9 (C-1'), 114.9 (C-3''), 122.4 (C-1''), 125.2 (C-5), 131.6 (C-2''), 147.9 (C-2), 149.9 (C-4), 150.6 (C-8), 158.3 (C-6), 161.2 (C-4'). **Análisis** (%) para  $C_{17}H_{18}N_4O_6$ . Calculado: C, 54.54; H, 4.85; N, 14.97. Encontrado: C, 54.41; H, 5.03; N, 14.70.

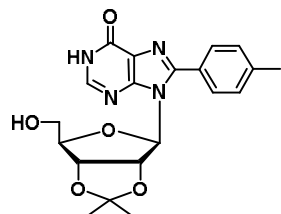
### 2',3'-O-Isopropiliden-8-(3''-metoxifenil)inosina (2.26)



Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis y purificación del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con 3-iodoanisol (152  $\mu$ L, 1.30 mmol) en presencia de  $Cs_2CO_3$  (528 mg, 1.62 mmol),  $CuI$  (371 mg, 1.95 mmol),  $Pd(OAc)_2$  (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26  $\mu$ L, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.2 mL). Se obtienen 148 mg de **2.26** (55%) como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  415 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.19, 1.41 (s, 6H,  $C(CH_3)_2$ ), 3.56 (m, 2H, H-5'), 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 4.09 (m, 1H, H-4'), 4.98 (m, 2H, H-3', OH), 5.50 (dd,  $J$  = 6.2, 2.8 Hz, 1H, H-2'), 5.86 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, H-1'), 7.22 (m, 3H, H-4'', H-5'', H-6''), 7.49 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-2''), 8.09 (s, 1H, H-2), 12.53 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  RMN (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  25.2, 27.0 ( $C(CH_3)_2$ ),

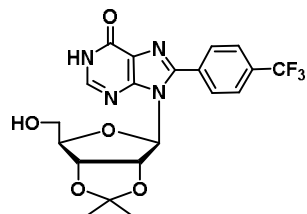
55.3 (OCH<sub>3</sub>), 61.5 (C-5'), 81.6 (C-3'), 82.5 (C-2'), 87.2 (C-4'), 90.1 (C-1'), 113.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 114.8, 116.0, 121.4 (C-4'', C-5'', C-6''), 124.5 (C-5), 130.0 (C-2''), 130.1 (C-1''), 145.9 (C-2), 148.5 (C-4), 149.4 (C-8), 156.4 (C-6), 159.3 (C-3'').

### 2',3'-O-Isopropiliden-8-tolilinosina (2.27)

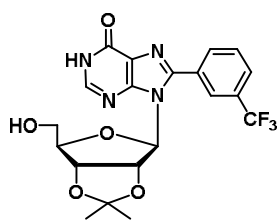


Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis y purificación del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con 4-iodotolueno (284 mg, 1.30 mmol) en presencia de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (528 mg, 1.62 mmol), CuI (371 mg, 1.95 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26 µL, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.2 mL). Se obtienen 158 mg de **2.27** (61%) como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): m/z 399 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27, 1.43 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.57 (m, 2H, H-5'), 4.12 (m, 1H, H-4'), 5.01 (m, 2H, H-3', OH), 5.51 (dd, *J* = 6.2, 2.7 Hz, 1H, H-2'), 5.86 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-1'), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3''), 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-2''), 8.12 (s, 1H, H-2), 12.52 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21.7 (CH<sub>3</sub>), 25.9, 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 62.2 (C-5'), 82.3 (C-3'), 83.1 (C-2'), 87.8 (C-4'), 90.8 (C-1'), 113.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 125.2 (C-5), 126.7 (C-1''), 130.0 (C-2''), 130.2 (C-3''), 140.8 (C-4''), 146.4 (C-2), 149.1 (C-4), 150.4 (C-8), 157.0 (C-6).

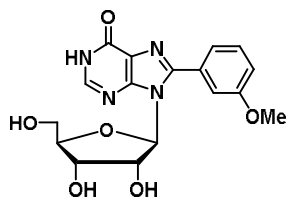
### 2',3'-O-Isopropiliden-8-(4''-trifluorometilfenil)inosina (2.28)



Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis y purificación del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con yoduro de 4-trifluorometilfenilo (191 µL, 1.30 mmol) en presencia de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (528 mg, 1.62 mmol), CuI (371 mg, 1.95 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26 µL, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.2 mL). Se obtienen 135 mg (46%) de **2.28** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): m/z 453 (M+H)<sup>+</sup>, 475 (M+Na)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27, 1.43 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.56 (m, 2H, H-5'), 4.15 (m, 1H, H-4'), 5.30 (m, 2H, H-3', OH), 5.53 (dd, *J* = 6.2, 2.3 Hz, 1H, H-2'), 5.87 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-1'), 7.97 (m, 4H, H-2'', H-3''), 8.17 (s, 1H, H-2), 12.60 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25.8, 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 62.2 (C-5'), 82.3 (C-3'), 83.3 (C-2'), 88.2 (C-4'), 90.8 (C-1'), 113.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124.6 (q ap, *J* = 272.2 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.4 (C-5), 126.6 (d, *J* = 3.1 Hz, C-3''), 130.9 (d, *J* = 31.9 Hz, C-4''), 130.9 (C-2''), 133.6 (C-1''), 146.7 (C-2), 148.8, 149.3 (C-8, C-4), 157.0 (C-6).

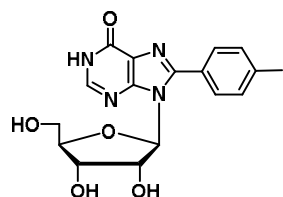
**2',3'-O-Isopropiliden-8-(3''-trifluorometilfenil)inosina (2.29)**

Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis y purificación del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con yoduro de 3-trifluorometilfenilo (187  $\mu$ L, 1.30 mmol) en presencia de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (528 mg, 1.62 mmol), CuI (371 mg, 1.95 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26  $\mu$ L, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.2 mL). Se obtienen 162 mg (55%) de **2.29** como un sólido anaranjado. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  453 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 475 ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  1.26, 1.40 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.52 (m, 2H, H-5'), 4.12 (m, 1H, H-4'), 4.99 (m, 2H, H-3', OH), 5.53 (dd,  $J = 6.3, 2.6$  Hz, 1H, H-2'), 5.82 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-1'), 7.83 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5''), 7.95 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-4''), 8.00 (m, 2H, H-2'', H-6''), 8.14 (s, 1H, H-2), 12.57 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  25.8, 27.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 62.1 (C-5'), 82.3 (C-3'), 83.1 (C-2'), 88.1 (C-4'), 91.0 (C-1'), 113.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 124.5 (q ap,  $J = 272.7$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 125.3 (C-5), 126.7 (d,  $J = 4.3$  Hz, C-2''), 127.6 (d,  $J = 4.1$  Hz, C-4''), 130.3 (d,  $J = 32.4$  Hz, C-3''), 130.7 (C-1''), 130.9 (C-5''), 133.9 (C-6''), 146.8 (C-2), 148.9 (C-4), 149.3 (C-8), 157.0 (C-6).

**8-(3''-Metoxifenil)inosina (2.30)**

Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.26** (100 mg, 0.24 mmol) con una disolución de TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /dioxano (3:1:1, 2.4 mL) durante 15 min. Se obtienen 76 mg (85%) de **2.30** como un sólido blanco. **Pf** 205-207 °C. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  375 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3.54, 3.67 (m, 2H, H-5'), 3.83 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.88 (m, 1H, H-4'), 4.15 (m, 1H, H-3'), 5.03 (s, 1H, OH), 5.10 (m, 1H, H-2'), 5.15 (s, 1H, OH), 5.47 (s, 1H, OH), 5.76 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H, H-1'), 7.15 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-4''), 7.29 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.49 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-5''), 8.12 (s, 1H, H-2), 12.35 (s a, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  55.6 ( $\text{OCH}_3$ ), 62.4 (C-5'), 71.1 (C-3'), 71.7 (C-2'), 86.6 (C-4'), 89.7 (C-1'), 115.2 (C-2''), 116.4 (C-4''), 122.1 (C-6''), 125.2 (C-5), 130.5 (C-5''), 130.8 (C-1''), 146.0 (C-2), 149.4 (C-4), 150.7 (C-8), 156.8 (C-6), 159.7 (C-3''). **Análisis** (%) para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6$ . Calculado: C, 54.54; H, 4.85; N, 14.97. Encontrado: C, 54.36; H, 5.08; N, 14.69.

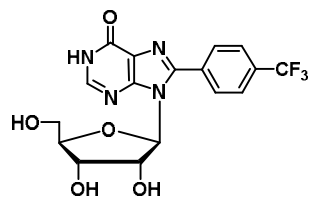
### 8-(4''-Metilfenil)inosina (2.31)



Seguendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.27** (100 mg, 0.25 mmol) con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/dioxano (3:1:1, 2.5 mL) durante 15 min.

Se obtienen 78 mg (87%) de **2.31** como un sólido blanco. **Pf** 295-297 °C. **EM** (ES, positivo): m/z 359 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.60 (m, 2H, H-5'), 3.87 (m, 1H, H-4'), 4.13 (m, 1H, H-3'), 5.07 (m, 3H, H-2', 2 OH), 5.44 (s, 1H, OH), 5.71 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 7.38 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3''), 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2''), 8.10 (s, 1H, H-2), 12.08 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21.7 (CH<sub>3</sub>), 62.7 (C-5'), 71.3 (C-3'), 71.8 (C-2'), 86.8 (C-4'), 90.0 (C-1'), 125.4 (C-5), 127.1 (C-1''), 130.0, 130.1 (C-2'', C-3''), 140.6 (C-4''), 146.2 (C-2), 149.6 (C-4), 151.2 (C-8), 157.3 (C-6). **Análisis** (%) para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>. Calculado: C, 56.98; H, 5.06; N, 15.63. Encontrado: C, 56.75; H, 5.35; N, 15.49.

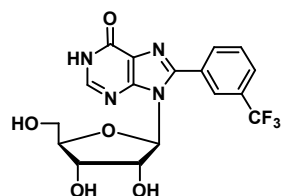
### 8-(4''-Trifluorometilfenil)inosina (2.32)



Seguendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.28** (100 mg, 0.22 mmol) con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/dioxano (3:1:1, 2.2 mL). Se obtienen 64 mg (70%) de **2.32** como un sólido blanco. **Pf** descompone a partir de 170 °C.

**EM** (ES, positivo): m/z 413 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.54, 3.67 (m, 2H, H-5'), 3.91 (dt, *J* = 7.4, 4.6 Hz, 1H, H-4'), 4.14 (m, 1H, H-3'), 5.08 (m, 2H, H-2', OH), 5.19 (s, 1H, OH), 5.46 (s, 1H, OH), 5.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 7.95 (s, 4H, H-2'', H-3''), 8.14 (s, 1H, H-2). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 62.3 (C-5'), 71.0 (C-3'), 71.7 (C-2'), 86.9 (C-4'), 89.8 (C-1'), 124.4 (c ap, *J* = 272.4 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.4 (C-5), 126.6 (d, *J* = 4.1 Hz, C-3''), 130.6 (d, *J* = 32.1 Hz, C-4''), 130.8 (C-2''), 133.7 (C-1''), 146.7 (C-2), 149.3 (C-4), 149.6 (C-8), 157.2 (C-6). **Análisis** (%) para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. Calculado: C, 49.52; H, 3.67; N, 13.59. Encontrado: C, 49.28; H, 3.89; N, 13.30.

### 8-(3''-Trifluorometilfenil)inosina (2.33)



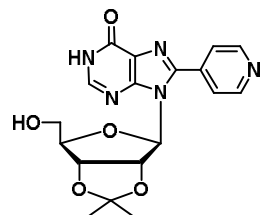
Seguendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.29** (100 mg, 0.22 mmol) con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/dioxano (3:1:1, 2.2 mL). Se obtienen 55 mg (60%) de **2.33** como un sólido blanco. **Pf** 193-195 °C.

**EM** (ES, positivo): m/z 413 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.54, 3.66 (m, 2H, H-5'), 3.90 (dt, *J* = 7.6, 4.7 Hz, 1H, H-4'), 4.14 (c ap, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-3'), 5.06 (m, 2H, H-2', OH), 5.17 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, OH), 5.48 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, OH), 5.69 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 7.84 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5''), 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4''), 8.05 (m, 2H, H-



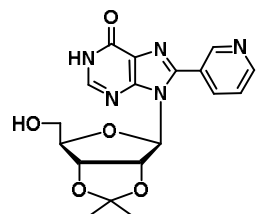
2'', H-6''), 8.16 (s, 1H, H-2). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 61.9 (C-5'), 70.5 (C-3'), 71.2 (C-2'), 86.3 (C-4'), 89.3 (C-1'), 123.8 (c ap, *J* = 272.3 Hz, CF<sub>3</sub>), 125.0 (C-5), 126.5 (d, *J* = 4.5 Hz, C-2''), 126.8 (d, *J* = 4.5 Hz, C-4''), 130.1 (d, *J* = 32.1 Hz, C-3''), 130.2, 130.3 (C-5'', C-1''), 133.3 (C-6''), 146.0 (C-2), 148.9 (C-8), 149.1 (C-4), 156.4 (C-6). **Análisis** (%) para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. Calculado: C, 49.52; H, 3.67; N, 13.59. Encontrado: C, 49.31; H, 3.93; N, 13.33.

### 2',3'-O-Isopropiliden-8-(4''-piridil)inosina (2.34)



Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con 4-iodopiridina (528 mg, 1.30 mmol) en presencia de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (266 mg, 1.62 mmol), CuI (371 mg, 1.95 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26 µL, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.3 mL). En este caso la reacción se trata con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, 150 mL) y se sigue la purificación habitual. Finalmente, se obtienen 138 mg (55%) de **2.34** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): *m/z* 386 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27, 1.44 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.55 (m, 2H, H-5'), 4.15 (m, 1H, H-4'), 5.02 (m, 2H, H-3', OH), 5.53 (dd, *J* = 6.3, 2.6 Hz, 1H, H-2'), 5.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-1'), 7.74 (s a, 2H, H-2''), 8.17 (s, 1H, H-2), 8.85 (s a, 2H, H-3''), 12.68 (s a, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25.9, 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 62.1 (C-5'), 82.3 (C-3'), 83.2 (C-2'), 88.3 (C-4'), 90.8 (C-1'), 113.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124.2 (C-2''), 125.5 (C-5), 137.0 (C-1''), 147.1 (C-2), 147.9 (C-3''), 149.5 (C-4), 151.0 (C-8), 157.0 (C-6).

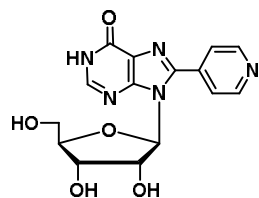
### 2',3'-O-Isopropiliden-8-(3''-piridil)inosina (2.35)



Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.23**, se hace reaccionar 2',3'-O-isopropilideninosina **2.22** (200 mg, 0.65 mmol) con 3-iodopiridina (528 mg, 1.30 mmol) en presencia de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (266 mg, 1.62 mmol), CuI (371 mg, 1.95 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol) y piperidina (26 µL, 0.26 mmol) en DMF anhidra (3.3 mL). La reacción se trata con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, 150 mL), y se sigue la purificación habitual. Se obtienen 135 mg (54%) de **2.35** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): *m/z* 386 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.27, 1.43 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.53 (m, 2H, H-5'), 4.13 (dt, *J* = 9.0, 5.9 Hz, 1H, H-4'), 5.00 (m, 2H, H-3', OH), 5.53 (dd, *J* = 6.2, 2.1 Hz, 1H, H-2'), 5.82 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-1'), 7.79 (m, 1H, H-5''), 8.15 (s, 1H, H-2), 8.17 (m, 1H, H-6''), 8.81 (m, 1H, H-4''), 9.29 (s, 1H, H-2''), 12.57 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 25.6, 27.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 61.9 (C-5'), 82.1 (C-3'), 83.0 (C-2'), 87.9 (C-4'), 90.6 (C-1'), 113.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 124.0 (C-

5''), 125.2 (C-5), 126.1 (C-1''), 137.0 (C-6''), 146.6 (C-8), 147.9 (C-2), 149.1 (C-4), 150.2 (C-2''), 151.4 (C-4''), 156.8 (C-6).

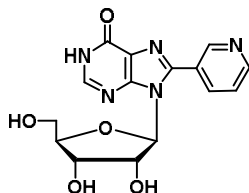
### 8-(4''-Piridil)inosina (2.36)



Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.34** (100 mg, 0.26 mmol) con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/dioxano (3:1:1, 2.6 mL) durante 15 min. Se obtienen 63 mg (78%) de **2.36** como un sólido blanco. **Pf** descompone a partir de 200 °C. **EM** (ES, positivo): m/z 346

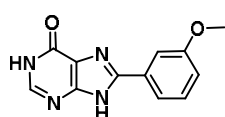
(M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.55, 3.68 (m, 2H, H-5'), 3.92 (dt, *J* = 7.4, 4.4 Hz, 1H, H-4'), 4.15 (m, 1H, H-3'), 4.95 (t, *J* = 6 Hz, 1H, OH), 5.05 (m, 1H, H-2'), 5.11 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, OH), 5.40 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, OH), 5.74 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.73 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-2''), 8.13 (s, 1H, H-2), 8.79 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H-3''), 12.52 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 61.7 (C-5'), 70.3 (C-3'), 71.2 (C-2'), 86.3 (C-4'), 89.2 (C-1'), 123.4 (C-2''), 125.0 (C-5), 136.5 (C-1''), 146.0 (C-2), 147.8 (C-8), 149.2 (C-4), 150.1 (C-3''), 156.2 (C-6). **Análisis** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>. Calculado: C, 52.17; H, 4.38; N, 20.38. Encontrado: C, 51.99; H, 4.52; N, 20.18.

### 8-(3''-Piridil)inosina (2.37)

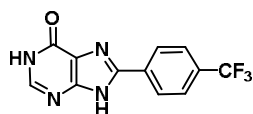


Siguiendo el procedimiento empleado para la síntesis del compuesto **2.24**, se trata **2.35** (100 mg, 0.26 mmol) con una disolución de TFA/H<sub>2</sub>O/dioxano (3:1:1, 2.6 mL) durante 15 min. Se obtienen 55 mg (69%) de **2.37** como un sólido blanco. **Pf**

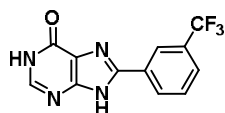
descompone a partir de 200 °C. **EM** (ES, positivo): m/z 346 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.25 (s a, 2H, 2 x OH), 3.53 (dd, *J* = 11.9, 4.2 Hz, 1H, H-5'), 3.66 (dd, *J* = 11.9, 4.0 Hz, 1H, H-5'), 3.91 (m, 1H, H-4'), 4.13 (m, 1H, H-3'), 5.06 (m, 1H, H-2'), 5.36 (s a, 1H, OH), 5.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 7.60 (dd, *J* = 7.5, 4.9 Hz, 1H, H-5''), 8.06 (s, 1H, H-2), 8.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6''), 8.74 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-4''), 8.89 (s, 1H, H-2''). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 62.5 (C-5'), 71.2 (C-3'), 71.9 (C-2'), 87.0 (C-4'), 89.8 (C-1'), 124.1 (C-5''), 125.5 (C-5), 126.3 (C-1''), 137.4 (C-6''), 147.5, 147.7 (C-8, C-2), 149.7 (C-4), 150.1 (C-2''), 151.1 (C-4''), 158.8 (C-6). **Análisis** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>. Calculado: C, 52.17; H, 4.38; N, 20.38. Encontrado: C, 52.02; H, 4.60; N, 20.20.

**8-(3'-Metoxifenil)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (2.40)**

El compuesto **2.30** (18 mg, 0.05 mmol) se trata con una disolución acuosa de TFA (pH=1.2, 0.5 mL) durante 24 h a 37 °C. Se rota a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol (10:1). Se obtienen 9 mg (75%) de **2.40** como un sólido blanco. **Pf** > 350 °C. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  243 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.02 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H-6'), 7.41 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 7.72 (m, 2H, H-2', H-4'), 7.99 (s, 1H, H-2), 12.29 (s, 1H, NH), 13.65 (s, 1H, NH).

**8-(4'-Trifluorometilfenil)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (2.41)**

El compuesto **2.32** (20 mg, 0.05 mmol) se trata con una disolución acuosa de TFA (pH=1.2, 0.5 mL) durante 24 h a 37 °C. Se rota a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol (10:1). Se obtienen 10 mg (71%) de **2.41** como un sólido blanco. **Pf** > 350 °C. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  281 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7.90 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H-2'), 8.03 (s, 1H, H-2), 8.29 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-3'), 8.39 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-3'), 12.31 (s, 1H, NH), 13.89 (s, 1H, NH).

**8-(3'-Trifluorometilfenil)-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona (2.42)**

El compuesto **2.33** (20 mg, 0.05 mmol) se trata con una disolución acuosa de TFA (pH=1.2, 0.5 mL) durante 24 h a 37 °C. Se rota a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC usando como eluyente diclorometano/metanol (10:1). Se obtienen 11 mg (78%) de **2.42** como un sólido blanco. **Pf** > 350 °C. **EM** (ES, positivo):  $m/z$  281 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  7.75 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-5'), 7.83 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-4'), 8.00 (s, 1H, H-2), 8.37 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, H-6'), 8.45 (s, 1H, H-2'), 12.31 (s, 1H, NH), 13.88 (s, 1H, NH).

**5.3. Estudios de estabilidad**

Para llevar a cabo estos ensayos se prepararon disoluciones de cada compuesto a estudiar, en disoluciones acuosas con pHs 1.2, 5.0 y 7.4 de concentraciones finales 50  $\mu$ M a partir de disoluciones patrón 50 mM en DMSO y se incubaron a 37 °C. Se analizan alícuotas de 100  $\mu$ l a determinados periodos de tiempo (0h, 1h, 4h y 24h) en un cromatógrafo HPLC Aligent Technologies 1120 Compact LC utilizando una columna de fase reversa ACE 5 C-18-300 (150 x 4.6 mm), empleando un detector Photodiode Array (PDA) y como fase móvil: A: ACN y B: H<sub>2</sub>O con 0.05% de TFA. En todos los casos el flujo fue de 1mL/min y se emplearon distintos tipos de gradientes para la correcta

separación de los picos observados en el cromatograma correspondientes a las inosinas 8-sustituidas y a las correspondientes bases nitrogenadas 8-ariladas que existen en la disolución en el momento de la medida.

#### 5.4. Estudios de fluorescencia

Se preparó una disolución de cada compuesto seleccionado de concentración final 50  $\mu\text{M}$  en PBS partiendo de una concentración patrón 5 mM en DMSO de cada compuesto. Las medidas de fluorescencia fueron realizadas usando el espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50B, además se usaron cubetas estándar de fluorescencia de paso óptico de 10 mm. La rendija de excitación se fijó a 15 nm y la de emisión a 20 nm, y los espectros fueron registrados en un intervalo de 1 nm y con una velocidad de barrido de 100 nm por minuto, obteniéndose las  $\lambda_{\text{ex}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  para cada compuesto.

##### 5.4.1. Ensayos frente a PNP humana y de procariotas.

La separación de la inosina y su correspondiente base hipoxantina se hizo por HPLC. Los compuestos (100  $\mu\text{M}$ ) fueron expuestos a las enzimas (20 nM PNP Hyor o 6 nM PNP humana) y se incubaron a 37 °C en buffer (pH = 6.5) en un volumen total de 500  $\mu\text{L}$ . Tras 60 min de incubación, se tomaron fracciones 100  $\mu\text{L}$  y se analizaron por HPLC. Para la actividad inhibitoria frente a la fosforolisis de inosina (100  $\mu\text{M}$ ), los compuestos se ensayaron a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  y los resultados de la incubación se midieron tras 60 min.

##### 5.4.2 Ensayo frente a PNP de *Plasmodium falciparum*

El curso de la reacción de fosforolisis se siguió al acoplarla a una reacción de xantinaoxidasa, que cataliza la oxidación de hipoxantina a ácido úrico y cuya formación se puede seguir a 293nm (coeficiente de extinción molar para el ácido úrico: 12.9  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Para determinar la actividad inhibitoria se incubó una mezcla que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 7.5), xantinaoxidasa (60mU), *Pf*PNP (0.73mg, 25nM) e inosina (25 $\mu\text{M}$ ) en un volumen final de 1 mL a 25 °C. Para los estudios de inhibición, se llevaron a cabo varios experimentos en donde la concentración de inhibidor era variable (5 concentraciones fueron ensayadas) y la concentración de inosina fija (25  $\mu\text{M}$ ).

Todos los espectros se registraron a una concentración 50  $\mu\text{M}$  en PBS a partir de una disolución stock 5 mM en DMSO. Todas las medidas se realizaron en celdas de cuarzo de paso óptico 10 mm. La rendija de excitación se fijó a 15 nm y la de emisión a 20 nm, y los espectros fueron registrados en un intervalo de 1 nm y con una velocidad de barrido de 100 nm por minuto.

Una mezcla que contiene 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.5, 268 nM (7.83mg) *Pf*PNP y 0.5 mM de nucleósido se incubó a temperatura ambiente entre 30min y 2 horas, y se registraron los espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 288\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 300\text{-}450\text{nm}$ ). Como controles se emplearon el propio nucleósido y su correspondiente base.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Thomsen, N. M.; Vongsutilers, V.; Gannett, P. The synthesis of C8-aryl purines, nucleosides and phosphoramidites. *Crit Rev Eukaryot Gen Expr* **2011**, *21*, 155–176.
- (2) Hung, M. H.; Stock, L. M. Reactions of benzenediazonium ions with guanine and its derivatives. *J Org Chem* **1982**, *47*, 448–453.
- (3) Chin, A.; Hung, M. H.; Stock, L. M. Reactions of benzenediazonium ions with adenine and its derivatives. *J Org Chem* **1981**, *46*, 2203–2207.
- (4) Gannett, P. M.; Lawson, T.; Miller, M.; Thakkar, D. D.; Lord, J. W.; Yau, W. M.; Toth, B. 8-Arylguanine adducts from arenediazonium ions and DNA. *Chem Biol Interact* **1996**, *101*, 149–164.
- (5) Arsenyan, P.; Ikaunieks, M.; Belyakov, S. Stille coupling approaches for the synthesis of 8-aryl guanines. *Tetrahedron Lett* **2007**, *48*, 961–964.
- (6) K. Vollmann, C. E. M. Synthesis of 8-substituted xanthine derivatives by Suzuki cross-coupling reaction. *Heterocycles* **2002**, *57*, 871–879.
- (7) Mayer, E.; Valis, L.; Huber, R.; Amann, N.; Wagenknecht, H. A. Preparation of pyrene- modified purine and pyrimidine nucleosides via Suzuki-Miyaura cross-couplings and characterization of their fluorescent properties. *Synthesis* **2003**, *2003*, 2335–2340.
- (8) Capek, P.; Pohl, R.; Hock, M. Cross-coupling reactions of unprotected halopurine bases, nucleosides, nucleotides and nucleoside triphosphates with 4-boronophenylalanine in water. Synthesis of (purin-8-yl)- and (purin-6-yl)phenylalanines. *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 2278–2284.
- (9) Western, E. C.; Shaughnessy, K. H. Inhibitory effects of the guanine moiety on Suzuki couplings of unprotected halonucleosides in aqueous media. *J Org Chem* **2005**, *70*, 6378–6388.
- (10) Western, E. C.; Daft, J. R.; Johnson, E. M.; Gannett, P. M.; Shaughnessy, K. H. Efficient one-step Suzuki arylation of unprotected halonucleosides, using water-soluble palladium catalysts. *J Org Chem* **2003**, *68*, 6767–6774.
- (11) Meng, X.; Moriuchi, T.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K.; Hirao, T. A G-octamer scaffold via self-assembly of a guanosine-based Au(I) isonitrile complex for Au(I)-Au(I) interaction. *Chem Commun* **2011**, *47*, 4682–4684.
- (12) Gurram, V.; Pottabathini, N.; Garlapati, R.; Chaudhary, A. B.; Patro, B.; Lakshman, M. K. C-C cross-coupling reactions of O6-alkyl-2-haloinosine derivatives and a one-pot cross-coupling/O6-deprotection procedure. *Chem Asian J* **2012**, *7*, 1853–1861.

- (13) Cerna, I.; Pohl, R.; Hocek, M. Direct C-H arylation of purines: development of methodology and its use in regioselective synthesis of 2,6,8-trisubstituted purines. *Org Lett* **2006**, *8*, 5389–5392.
- (14) Cerna, I.; Pohl, R.; Klepetárová, B.; Hocek, M. Synthesis of 6,8,9-tri- and 2,6,8,9-tetrasubstituted purines by a combination of the Suzuki cross-coupling, N-arylation, and direct C-H arylation reactions. *J Org Chem* **2008**, *73*, 9048–9054.
- (15) Cerna, I.; Pohl, R.; Hocek, M. The first direct C-H arylation of purine nucleosides. *Chem Commun* **2007**, *45*, 4729–4730.
- (16) Storr, T. E.; Firth, A. G.; Wilson, K.; Darley, K.; Baumann, C. G.; Fairlamb, I. J. S. Site-selective direct arylation of unprotected adenine nucleosides mediated by palladium and copper: insights into the reaction mechanism. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6125–6137.
- (17) Storr, T. E.; Baumann, C. G.; Thatcher, R. J.; De Ornellas, S.; Whitwood, A. C.; Fairlamb, I. J. S. Pd(0)/Cu(I)-mediated direct arylation of 2'-deoxyadenosines: mechanistic role of Cu(I) and reactivity comparisons with related purine nucleosides. *J Org Chem* **2009**, *74*, 5810–5821.
- (18) Uesugi, S.; Ikehara, M. Carbon-13 magnetic resonance spectra of 8-substituted purine nucleosides. Characteristic shifts for the syn conformation. *J Am Chem Soc* **1977**, *99*, 3250–3253.
- (19) Nair, V.; Young, D. A. Conformational correlation of purine nucleosides by high-field carbon-13 NMR data. *Magn Reson Chem* **1987**, *25*, 937–940.
- (20) Vongsutilers, V.; Phillips, D. J.; Train, B. C.; Mckelvey, G. R.; Thomsen, N. M.; Shaughnessy, K. H.; Lewis, J. P.; Gannett, P. M. The conformational effect of para-substituted C8-arylguanine adducts on the B/Z-DNA equilibrium. *Biophys Chem* **2011**, *154*, 41–48.
- (21) Dai, J.; Sloat, A. L.; Wright, M. W.; Manderville, R. A. Role of phenoxyl radicals in DNA adduction by chlorophenol xenobiotics following peroxidase activation. *Chem Res Toxicol* **2005**, *18*, 771–779.
- (22) Witham, A. A.; Beach, D. G.; Gabryelski, W.; Manderville, R. A. Hydroxyl radical-induced oxidation of a phenolic C-linked 2'-deoxyguanosine adduct yields a reactive catechol. *Chem Res Toxicol* **2012**, *25*, 315–325.
- (23) Dai, Q.; Xu, D.; Lim, K.; Harvey, R. G. Efficient syntheses of C(8)-aryl adducts of adenine and guanine formed by reaction of radical cation metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *J Org Chem* **2007**, *72*, 4856–4863.



- (24) Millen, A. L.; Manderville, R. A.; Wetmore, S. D. Conformational flexibility of C8-phenoxyl-2'-deoxyguanosine nucleotide adducts. *J Phys Chem B* **2010**, *114*, 4373–4382.
- (25) Valis, L. E.; Mayer, E. E.; Wagenknecht, H. A. 8-(Pyren-1-yl)-2'-deoxyguanosine as an optical probe for DNA hybridization and for charge transfer with small peptides. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 3184–3187.
- (26) Storr, T. E.; Strohmeier, J. A.; Baumann, C. G.; Fairlamb, I. J. S. A sequential direct arylation/Suzuki-Miyaura cross-coupling transformation of unprotected 2'-deoxyadenosine affords a novel class of fluorescent analogues. *Chem Commun* **2010**, *46*, 6470–6472.
- (27) Kim, D.; Jun, H.; Lee, H.; Hong, S. S.; Hong, S. Development of new fluorescent xanthines as kinase inhibitors. *Org Lett* **2010**, *12*, 1212–1215.
- (28) Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications. *Chem Rev* **2010**, *110*, 2579–25619.
- (29) Rankin, K. M.; Sproviero, M.; Rankin, K.; Sharma, P.; Wetmore, S. D.; Manderville, R. A. C8-heteroaryl-2'-deoxyguanosine adducts as conformational fluorescent probes in the NarI recognition sequence. *J Org Chem* **2012**, *77*, 10498–10508.
- (30) Collier, A.; Wagner, G. K. A fast synthetic route to GDP-sugars modified at the nucleobase. *Chem Commun* **2008**, *2*, 178–180.
- (31) Collier, A.; Wagner, G. A facile two-step synthesis of 8-arylated guanosine mono- and triphosphates (8-aryl GXP). *Org Biomol Chem* **2006**, *4*, 4526–4532.
- (32) Läppchen, T.; Pinas, V. A.; Hartog, A. F.; Koomen, G. J.; Schaffner-Barbero, C.; Andreu, J. M.; Trambaiolo, D.; Löwe, J.; Juhem, A.; Popov, A. V.; Blaauwen, T. Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol* **2008**, *15*, 189–199.
- (33) Bhaumik, D.; Medin, J.; Gathy, K.; Coleman, M. S. Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 5464–5470.
- (34) Mills, G. C.; Schmalstieg, F. C.; Trimmer, K. B.; Goldman, A. S.; Goldblum, R. M. Purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **1976**, *73*, 2867–2871.
- (35) Jie-ying, L.; Thakur, S. A.; Zalinger, Z. B.; Gerrish, K. E.; Imani, F. Inosine-containing RNA is a novel innate immune recognition element and reduces RSV infection. *PLoS One* **2011**, *6*, e26463.

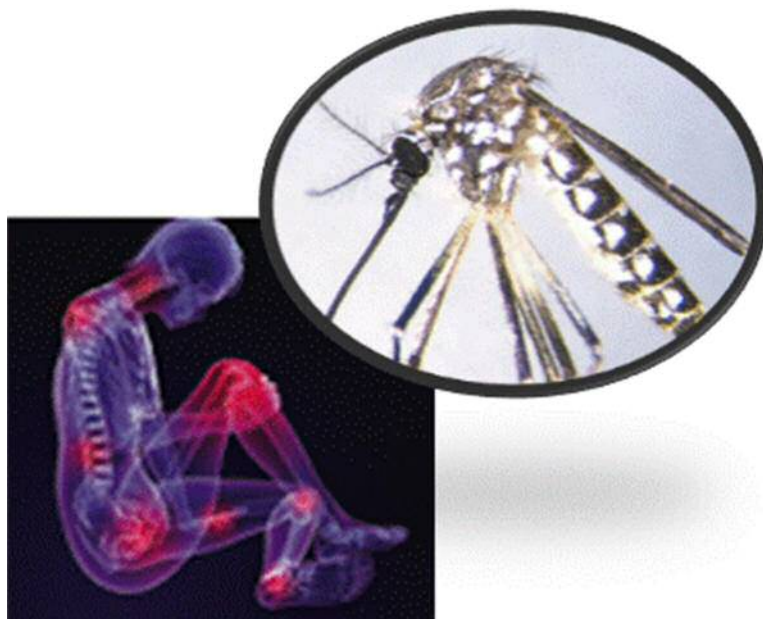
- (36) Chung, D. H.; Strouse, J. J.; Sun, Y.; Arterburn, J. B.; Parker, W. B.; Jonsson, C. B. Synthesis and anti-Hantaan virus activity of N(1)-3-fluorophenyl-inosine. *Antiviral Res* **2009**, *83*, 80–85.
- (37) Signorelli, K. L.; Hadden, J. W. T cell immunostimulation by methyl inosine 5'-monophosphate: application to infectious diseases. *Int Immunopharmacol* **2003**, *3*, 1177–1186.
- (38) Liekens, S.; Hernández, A. I.; Ribatti, D.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetitive mechanism of action. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 29598–29605.
- (39) Liekens, S.; Bronckaers, A.; Hernández, A. I.; Priego, E. M.; Casanova, E.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J. 5'-O-tritylated nucleoside derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis. *Mol Pharmacol* **2006**, *70*, 501–509.
- (40) Casanova, E.; Hernandez, A. I.; Priego, E. M.; Liekens, S.; Camarasa, M. J.; Balzarini, J.; Pérez-Pérez, M. J. 5'-O-Tritylinosine and analogues as allosteric inhibitors of human thymidine phosphorylase. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5562–5570.
- (41) Liekens, S.; Bronckaers, A.; Belleri, M.; Bugatti, A.; Sienaert, R.; Ribatti, D.; Nico, B.; Gigante, A.; Casanova, E.; Opdenakker, G.; Pérez-Pérez, M. J.; Balzarini, J.; Presta, M. The thymidine phosphorylase inhibitor 5'-O-tritylinosine (KIN59) is an antiangiogenic multitarget fibroblast growth factor-2 antagonist. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 817–829.
- (42) Koellner, G.; Luić, M.; Shugar, D.; Saenger, W.; Bzowska, A. Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase in a complex with hypoxanthine at 2.15 Å resolution. *J Mol Biol* **1997**, *265*, 202–216.
- (43) Sahnoun, S.; Messaoudi, S.; Peyrat, J. F.; Brion, J. D.; Alami, M. Microwave-assisted Pd(OH)<sub>2</sub>-catalyzed direct C–H arylation of free-(NH<sub>2</sub>) adenines with aryl halides. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49*, 7279–7283.
- (44) Gaetke, L. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **2003**, *189*, 147–163.
- (45) Kennedy, D. C.; McKay, C. S.; Legault, M. C. B.; Danielson, D. C.; Blake, J.; Pegoraro, A. F.; Stolor, A.; Mester, Z.; Pezacki, J. P. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 17993–18001.
- (46) Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50*, 8794–8804.

- (47) Vanková, B.; Krchnák, V.; Soural, M.; Hlavác, J. Direct C-H arylation of purine on solid phase and its use for chemical libraries synthesis. *ACS Comb Sci* **2011**, *13*, 496–500.
- (48) Cui, H.; Ruda, G. F.; Carrero-Lérida, J.; Ruiz-Pérez, L. M.; Gilbert, I. H.; González-Pacanowska, D. Exploring new inhibitors of *Plasmodium falciparum* purine nucleoside phosphorylase. *Eur J Med Chem* **2010**, *45*, 5140–5149.
- (49) Cassera, M. B.; Hazleton, K. Z.; Merino, E. F.; Obaldia, N.; Ho, M.-C.; Murkin, A. S.; DePinto, R.; Gutierrez, J. A.; Almo, S. C.; Evans, G. B.; Babu, Y. S.; Schramm, V. L. *Plasmodium falciparum* parasites are killed by a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase in a primate animal model. *PLoS One* **2011**, *6*, e26916.
- (50) Pergolizzi, G.; Butt, J. N.; Bowater, R. P.; Wagner, G. K. A novel fluorescent probe for NAD-consuming enzymes. *Chem Commun* **2011**, *47*, 12655–12657.



# Capítulo 3

## Enfermedades virales emergentes: derivados heterocíclicos frente al virus chikungunya





## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas epidemiológicos y sanitarios del mundo global actual es la incidencia creciente de enfermedades causadas por patógenos fuera de su entorno natural. El intercambio constante de personas y mercancías desde puntos muy distantes puede conducir a brotes virulentos de dimensiones difíciles de prever, y es por ello que existe una preocupación internacional que mantiene una red mundial de alerta.<sup>1,2</sup> Una de las enfermedades emergentes por las que existe preocupación entre los epidemiólogos es la fiebre de chikungunya. Esta enfermedad está causada por un virus y se transmite por la picadura de mosquitos infectados.<sup>3</sup>

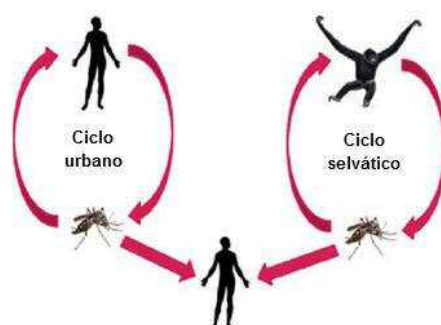
Chikungunya es una palabra makonde, lengua de Tanzania y Mozambique, y significa “hombre encorvado o retorcido”. Así describen en estas zonas africanas la postura física que adoptan los pacientes como consecuencia de la artralgia severa (dolor articular) que provoca la enfermedad. La palabra chikungunya designa tanto al virus (CHIKV) como a la enfermedad (Figura 3.1).<sup>4</sup>



**Figura 3.1.** Morfología del virus chikungunya

CHIKV es endémico de África y Asia, y fue aislado por primera vez en Tanzania en 1953.<sup>5,6</sup> En estos más de 50 años, se han producido diversos brotes pero la baja mortalidad hacía que la enfermedad pasase casi inadvertida. En Asia, la primera aparición fue en Filipinas en 1954 y después se describieron casos en Tailandia, Sri Lanka, Vietnam, Pakistán, Camboya, Laos, Birmania e India.<sup>7,8</sup> Entre 1982-1985 se extendió a Indonesia y en 1998 se dio el primer caso en Malasia.

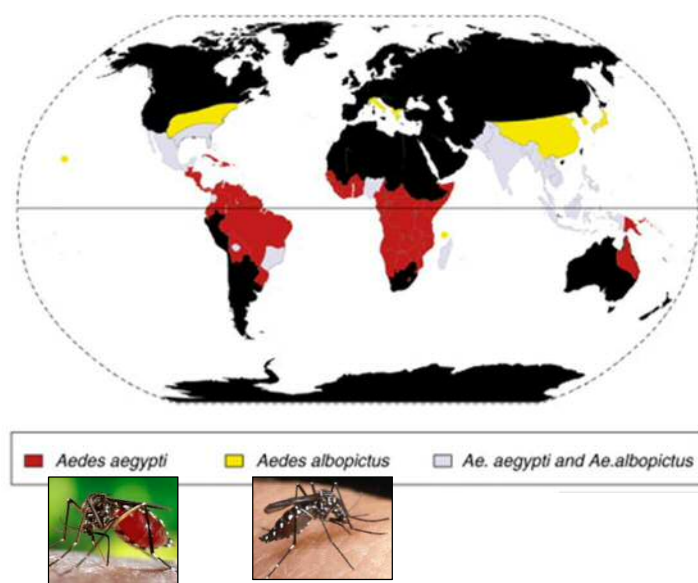
La fiebre de chikungunya es una enfermedad arboviral, causada por el virus chikungunya y transmitida por mosquitos.<sup>9</sup> El principal vector es el *Aedes aegypti*, responsable también de la fiebre amarilla.<sup>10</sup> Los ciclos de transmisión de este virus pueden ser hombre-mosquito-hombre (ciclo urbano) o animal-mosquito-hombre (ciclo selvático) (Figura 3.2).<sup>11</sup>



**Figura 3.2.** Ciclos de transmisión del virus chikungunya

En los años 2006-2007 se produjo un cambio sustancial en la consideración de esta enfermedad cuando un brote de la misma afectó a la isla de La Réunion, territorio francés en el Índico. Prácticamente el 40% de una población de 785.000 habitantes de la isla sufrió la enfermedad y además se produjeron más de 200 muertes.<sup>12</sup> Desde allí llegó a la India y afectó a 1,4 millones de personas, habiéndose producido el anterior brote 32 años atrás.<sup>2</sup>

El brote en la isla La Réunion, al tratarse de territorio francés, puso en marcha toda la maquinaria epidemiológica y así en solo dos años se tuvo un conocimiento tanto de la enfermedad como del agente etiológico muy superior al de las dos décadas precedentes. La alarma surgió al ver que la transmisión se debía a los mosquitos *Ae. albopictus*, que abundaban en la isla, y no al vector natural los *Ae. aegypti*, mucho menos abundantes en La Réunion.<sup>13</sup> Se pudo determinar que la adaptación a este vector se había producido por una mutación de alanina por valina en la glicoproteína de la envoltura del virus (E1-A226V) (Figura 3.3).<sup>14</sup>



**Figura 3.3.** Principales vectores del chikungunya y su distribución global



Además, esta mutación facilitó la reproducción del virus en el mosquito de modo que se alcanzaban concentraciones hasta 100 veces superiores en sus glándulas salivales, lo que se traducía en una mayor probabilidad de transmisión en la siguiente picadura.<sup>15</sup>

Los *Ae. albopictus* son más infectivos que los *Ae. aegypti*, además son muy agresivos, silenciosos, diurnos y sobreviven tanto en el entorno urbano como en el rural. Tienen una vida media de un mes y pueden perdurar varias semanas más si las temperaturas oscilan entre los 25-30 °C (4-8 semanas). Sus huevos son muy resistentes y aguantan incluso en la estación seca. Hay que destacar que el *Ae. albopictus*, también conocido como mosquito tigre, está cada vez más extendido en zonas templadas de Europa, Estados Unidos o Australia.<sup>14</sup>

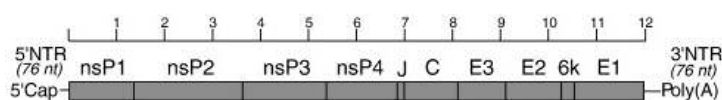
En el hombre la infección se produce inicialmente en los fibroblastos de la piel, tras la picadura por un mosquito infectado, luego se disemina al hígado, a los músculos y a las articulaciones presuntamente a través de la sangre.<sup>16</sup> El periodo de incubación es de 1-12 días seguido de fiebre alta (39-40 °C), sarpullidos, dolores de cabeza, fotofobia, mialgia y sobre todo por una artralgia muy severa.<sup>17,18,19</sup> Es rara la infección asintomática por CHIKV. La poliartralgia es la característica principal de la mayoría de los casos identificados. Casi todos los pacientes presentan artralgia simétrica y casi siempre afecta a más de una articulación: dedos, muñecas, rodillas, tobillos, etc. En el periodo de 1-2 semanas los síntomas desaparecen exceptuando la artralgia, que en un 60% de los pacientes persiste durante meses o años.<sup>20</sup>

Existen 2 fases de la enfermedad: aguda y crónica.<sup>21</sup> La fase crónica se caracteriza por fluctuaciones en la intensidad y en las recaídas, además suelen verse afectadas las mismas articulaciones que en la fase aguda. Aunque la fase crónica es menos severa que la fase aguda, ésta supone una pérdida de movilidad en las articulaciones de manera que disminuye notablemente la calidad de vida de las personas infectadas. La probabilidad de desarrollar una artralgia crónica es dependiente de la edad, aunque también son poblaciones de riesgo los niños y los adultos inmunodeprimidos. Además en el brote de la isla La Réunion se observó la transmisión vertical del CHIKV, produciéndose algunas muertes fetales y síntomas de la infección en algunos neonatos que desarrollaron meningoencefalitis.<sup>22,23</sup>

Otras manifestaciones clínicas que se asocian a esta enfermedad son: conjuntivitis, diarrea, vómitos, dolor abdominal, neumonía, fallo pre-renal y respiratorio.<sup>24,25</sup> Las hemorragias son raras y esta característica es importante porque es lo que le diferencia

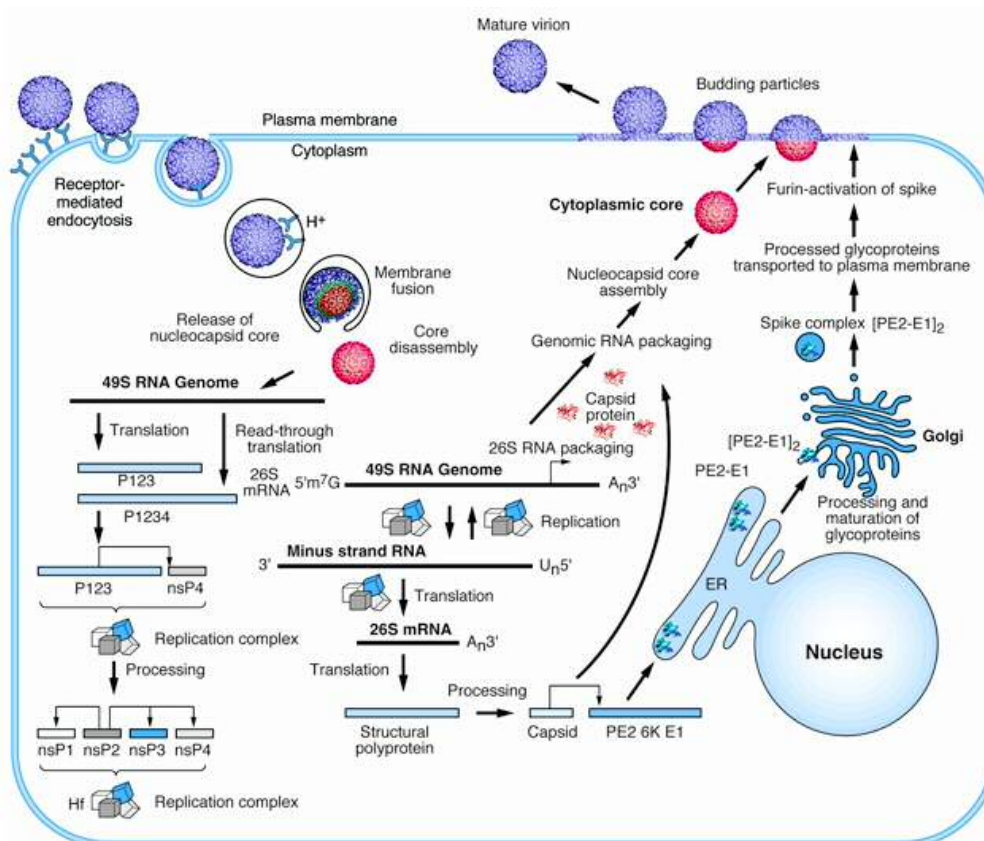
de la fiebre del dengue, que se transmite de un modo similar. Chikungunya no es un virus neurotrópico pero existen evidencias de implicaciones neurológicas durante la infección.<sup>26</sup> Algunas de las manifestaciones neurológicas son: encefalopatía, parálisis aguda y síndrome de Guillain-Barré (trastorno neurológico autoinmune).<sup>27,28</sup>

El virus chikungunya es un miembro de la familia de los *Togaviridae* y pertenece al género de los alfavirus.<sup>29</sup> Los alfavirus son virus de ARN monocatenario positivo que presentan una envoltura y una nucleocápsida de simetría icosaédrica. Los alfavirus constan de 29 especies de arbovirus (arthropodo-borne viruses), es decir, virus transmitidos por mosquitos. Estos se han clasificado en 7 complejos basados en sus propiedades antigénicas.<sup>3</sup> En concreto el virus chikungunya pertenece al complejo antigénico Bosque Semliki (SF). En la figura 3.4 se muestra su genoma en donde se aprecian dos secciones diferenciadas de lectura. La primera codifica para proteínas no estructurales (complejo replicativo): nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4; mientras que la segunda codifica para las proteínas estructurales: C (cápsida), E1, E2 y E3 (envoltura).



**Figura 3.4.** Genoma del virus chikungunya

En la figura 3.5 se puede observar el ciclo replicativo de los alfavirus.<sup>29</sup> El virus es reconocido por unos receptores de la membrana celular permitiendo su entrada al citoplasma por endocitosis. El bajo pH del endosoma conlleva a una reorganización conformacional de la envoltura del virus (E1-E2) exponiendo el dominio del péptido E1 hacia la membrana endosomal. Este pH ácido es esencial para la fusión de las membranas viral y endosomal, que permite la liberación del material genético del virus al citoplasma. El ARN viral sirve de molde tanto para la traducción a proteínas como para la replicación del ARN. Para este último proceso, el ARN (+) es reconocido por el complejo replicativo para generar la copia ARN (-) que posteriormente vuelve a ser copiada para dar el ARN (+) de los nuevos virus. Replicado el material genético y sintetizadas las glicoproteínas de la cápsida y la envoltura, el virus sale de la célula por exocitosis.



**Figura 3.5.** Ciclo replicativo de los alfavirus

Actualmente la fiebre de chikungunya se ha identificado en casi 40 países. No existe tratamiento específico ni vacuna comercialmente disponible para prevenir la infección por este virus. Generalmente se administran antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol para paliar la sintomatología, y en los casos más severos se receta ribavirina y la cloroquina (Figura 3.6), fármaco para la malaria. La ribavirina alivia la inflamación y los efectos de la artralgia, pero tiene un efecto antiviral moderado en cultivos celulares.<sup>30</sup> La cloroquina también muestra actividad antiinflamatoria e inhibe la infección por CHIKV en cultivos celulares a través de efectos en la acidificación endosomal, es decir, bloquea la disminución del pH del endosoma y así inhibe la expansión del virus pero no es capaz de frenar la replicación del mismo una vez que está en el citoplasma.<sup>31</sup> Además existen estudios contradictorios en humanos acerca de sus efectos beneficiosos.

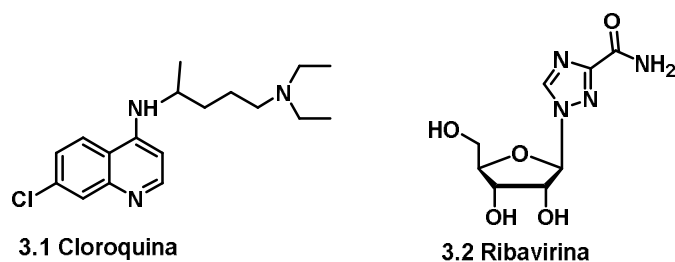


Figura 3.6

La importancia creciente y posible expansión de este virus ha llevado a activar distintas estrategias que ayuden a la prevención y/o tratamiento de la enfermedad.<sup>15</sup> Como en otras enfermedades transmitidas por picaduras de artrópodos, un campo muy activo en prevención es luchar contra el trasmisor mediante el uso de insecticidas o la liberación masiva de mosquitos machos estériles.<sup>32</sup> Igualmente se está trabajando en el desarrollo de vacunas. Así un consorcio de instituciones francesas retomó una vacuna inicialmente desarrollada por la Armada americana en los años 80 con una cepa atenuada del virus, que se discontinuó por cambio de prioridades.<sup>33</sup> Más recientemente, investigadores holandeses han comunicado resultados prometedores con una nueva vacuna.<sup>34</sup>

En paralelo, se han iniciado amplias campañas de cribado de compuestos tanto de productos naturales<sup>35-38</sup> como sintéticos,<sup>39</sup> que permitan identificar antivirales eficaces. Así se ha descrito un producto natural procedente de una planta vietnamita, Trigowiin A, que presenta una moderada actividad antiviral (Figura 3.7).<sup>37</sup> Al elucidar su estructura se observó la semejanza de su esqueleto a otros diterpenos conocidos. Esto condujo a la evaluación de estos diterpenos descritos como antivirales. Como ejemplo cabe mencionar la prostratina y el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ya que han mostrado una inhibición del orden micro y nanomolar. Sin embargo, el bajo perfil de seguridad del TPA como inductor tumoral lo descarta como posible antiviral.

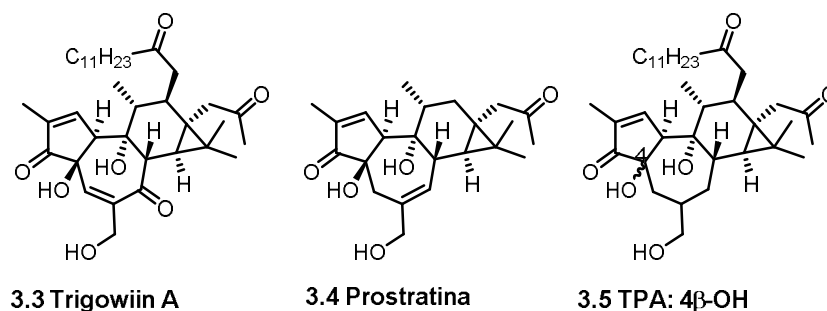
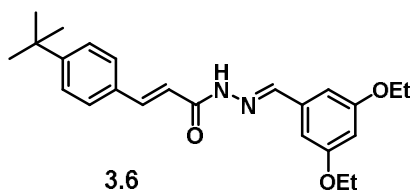


Figura 3.7. Productos naturales con actividad anti-CHIKV

En 2013 se ha descrito la identificación mediante cribado virtual y posterior optimización de inhibidores de la proteasa de CHIKV, cuyo prototipo es el compuesto **3.6** con inhibición en el rango micromolar (Figura 3.8).<sup>39</sup>



**Figura 3.8**



## 2. ANTECEDENTES

Como se comentaba en la introducción no existe tratamiento específico ni vacuna comercialmente disponible para prevenir o tratar la infección por el virus chikungunya. De ahí la importancia de encontrar compuestos eficaces para poder combatir esta enfermedad reemergente.

En el grupo del Prof. Johan Neyts del Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica) se ha iniciado un amplio programa de cribado para identificar compuestos cabezas de serie que puedan inhibir la replicación de este virus. En el año 2011 desde nuestro grupo de investigación se procedió al envío de aproximadamente cien muestras procedentes de nuestra quimioteca histórica, es decir, compuestos que habían sido sintetizados a lo largo de los años en distintos proyectos. De los productos enviados, la muestra etiquetada como **TP-274** mostró inhibición significativa de la replicación viral a una concentración efectiva 50, o  $CE_{50}$ , de 25  $\mu\text{g/mL}$  y ausencia de toxicidad en células no infectadas ( $CC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ). El análisis de esta muestra por HPLC-MS indicó la existencia de dos compuestos, con tiempos de retención 3.52 y 5.04 min, en una relación aproximada 1:1 y picos moleculares con valor  $m/z$  287.6 y distribución isotópica de Cl, y  $m/z$  269.1, respectivamente. El primer pico correspondía al producto inicialmente sintetizado, mientras que la masa molecular del segundo parecía indicar la hidrólisis del producto inicial. Se procedió a su separación, caracterización y se sometieron a evaluación por separado, etiquetados como **3.7** y **3.8** (Figura 3.9). Los datos obtenidos tras su evaluación revelaron que el compuesto **3.8**, procedente de la hidrólisis, era el responsable de la actividad, con una  $CE_{50}$  de 5  $\mu\text{g/mL}$  mientras que el derivado con cloro (**3.7**) era inactivo ( $CE_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ ).

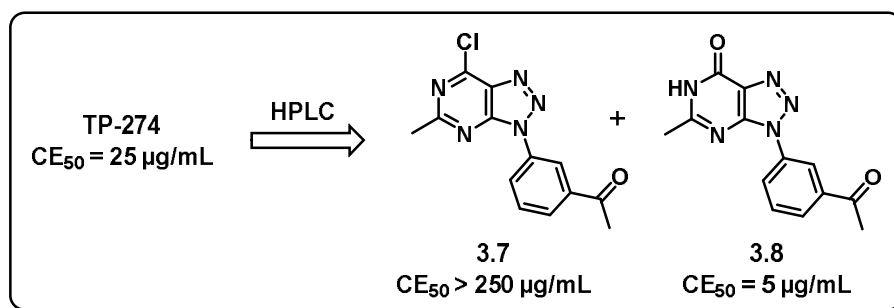


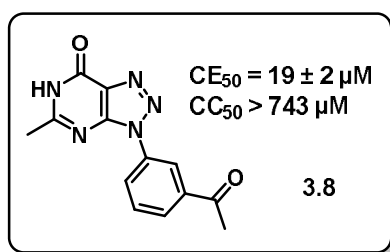
Figura 3.9





### 3. OBJETIVOS

Actualmente existe un notable interés en la búsqueda de fármacos frente al CHIKV debido a los brotes reemergentes y a la expansión geográfica de la enfermedad. Como se acaba de comentar en los antecedentes, de la evaluación de nuestra quimioteca de compuestos, se ha identificado la [1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona **3.8** (Figura 3.10) como un inhibidor de la replicación del virus chikungunya. Los valores de  $CE_{50}$  ( $19 \pm 2 \mu\text{M}$ ) y  $CC_{50}$  ( $>743 \mu\text{M}$ ) avalaban su interés como cabeza de serie. Su estructura química no descrita, su bajo peso molecular y su accesibilidad sintética le convertían en un buen compuesto prototipo para el inicio de una línea de trabajo que estudiara la síntesis de derivados de triazolopirimidinonas y su evaluación como inhibidores de la replicación del virus chikungunya.



**Figura 3.10**

Por ello en el presente capítulo se describe la síntesis y evaluación de análogos estructurales del compuesto patrón **3.8** frente a la replicación de CHIKV. Así, los objetivos principales de este capítulo han sido:

- Mejorar la potencia inhibitoria frente a la replicación del CHIKV ( $EC_{50}$ ) y/o disminuir la concentración citotóxica ( $CC_{50}$ ), a fin de mejorar el índice de selectividad ( $IS = CC_{50}/EC_{50}$ ).
- Establecer las relaciones estructura-actividad en esta familia de compuestos para la inhibición de la replicación del CHIKV.
- Ensayar los compuestos que presenten un mejor perfil de actividad frente a otros alfavirus.

Para la consecución de estos objetivos se han realizado modificaciones estructurales en los diferentes fragmentos de la molécula (Figura 3.11):

## Objetivos

- Base heterocíclica (esqueleto de [1,2,3]triazolopirimidin-7-ona): modificando las posiciones 2, 5, 6 y 7.
- Anillo aromático: incorporando sustituyentes tanto electrodonadores como electroaceptores dispuestos en diferentes posiciones (*meta*, *orto* y *para*).
- Nexo de unión: incorporando un metileno como nexo entre la base heterocíclica y el anillo aromático.

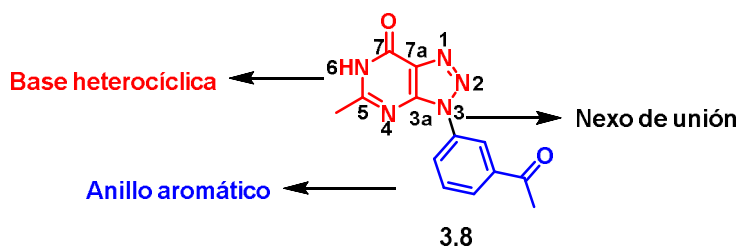


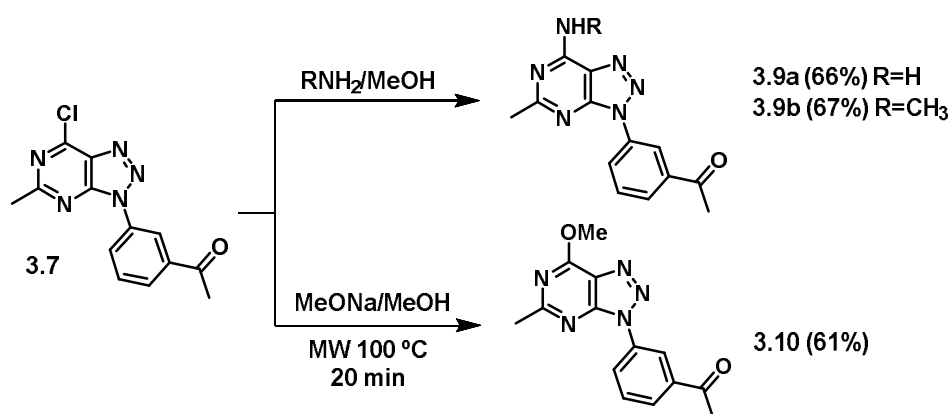
Figura 3.11

La evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación del CHIKV ha sido efectuada por el grupo del Prof. Johan Neyts del Instituto Rega de la Universidad de Lovaina (Bélgica). Estos ensayos se han simultaneado con la síntesis de modo que los resultados obtenidos de la evaluación antiviral han ido condicionando las modificaciones sintéticas realizadas. Por ello, la síntesis y evaluación anti-CHIKV serán comentadas conjuntamente en el apartado de Resultados y discusión.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

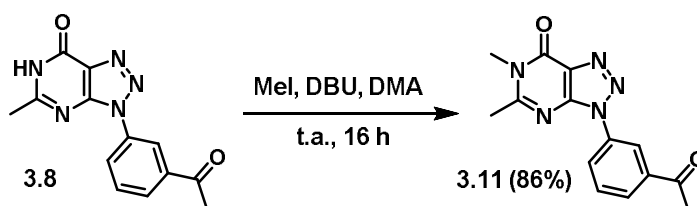
### 4.1. Modificaciones en la base heterocíclica

Las primeras variaciones realizadas sobre el compuesto prototipo **3.8** han permitido explorar pequeñas modificaciones en las posiciones 6 ó 7 del heterociclo, así como sustituir el anillo de triazol por un anillo de imidazol. Para ello, se llevó a cabo la sustitución del grupo carbonilo en la posición 7 por los grupos amino, metilamino y metoxi (Esquema 3.1). El tratamiento de **3.7** con amoniaco en metanol o metilamina en metanol dio lugar a los compuestos **3.9a** y **3.9b** con rendimientos del 66 y 67% respectivamente. Por otro lado, cuando el compuesto **3.7** se trató con metóxido sódico en metanol mediante irradiación por microondas a 100 °C durante 20 min, se obtuvo el compuesto **3.10**, con un grupo metoxi en posición 7, con buen rendimiento.



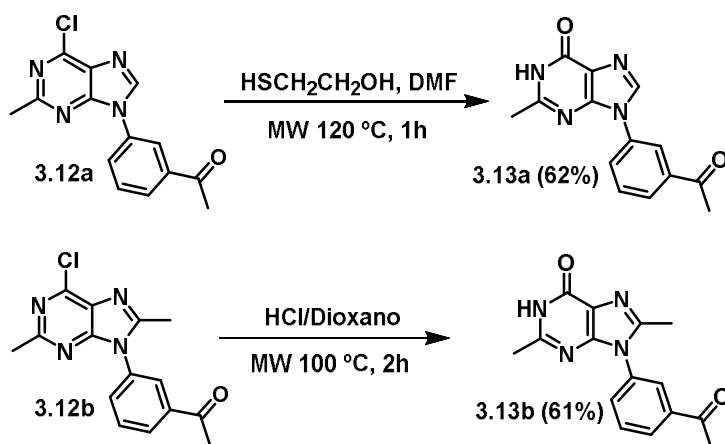
Esquema 3.1

Además se incorporó un grupo metilo en el N-6 del heterociclo. Para ello el compuesto **3.8** se trató con yoduro de metilo y DBU en *N,N*-dimetilacetamida a temperatura ambiente obteniéndose el compuesto **3.11** con un 86% de rendimiento (Esquema 3.2).



Esquema 3.2

Para la síntesis de las imidazopirimidinonas **3.13a** y **3.13b**, se partió de los cloro derivados **3.12a** y **3.12b**, previamente descritos por nuestro grupo.<sup>40</sup> Así, el compuesto **3.12a** se trató con metóxido sódico y mercaptoetanol en DMF calentando al microondas a 120 °C durante 1 h obteniéndose el compuesto **3.13a** con un 62% de rendimiento. El compuesto **3.13b** se obtuvo con un 61% de rendimiento a partir del compuesto **3.12b** mediante tratamiento con ácido clorhídrico en dioxano por calentamiento al microondas a 100 °C durante 2h (Esquema 3.3).

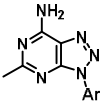
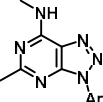
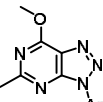
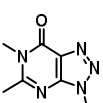
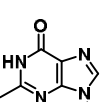
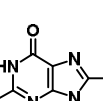
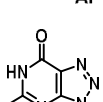


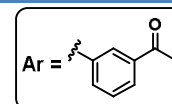
Esquema 3.3

Los compuestos **3.9a**, **3.9b**, **3.10**, **3.11**, **3.13a** y **3.13b** fueron evaluados frente al virus chikungunya en células Vero y en la tabla 3.1 se pueden ver los datos obtenidos junto con **3.8**, compuesto prototipo. En esta primera tabla también se incluye la cloroquina como compuesto de referencia.<sup>37</sup> Los resultados se expresan como concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>), que indica la concentración efectiva a la que un compuesto protege al 50% de las células frente al efecto citopático del virus. Para aquellos compuestos que han mostrado actividad significativa se ha determinado la CE<sub>90</sub>, o concentración de compuesto que protege al 90% de las células del efecto citopático viral. En paralelo se ha determinado la CC<sub>50</sub>, que es la concentración a la que aparece un daño celular evidente al 50% de los cultivos tratados no infectados. El parámetro IS o índice de selectividad es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>. Este parámetro es indicativo de la seguridad del compuesto.

Como se puede observar en la tabla 3.1, el compuesto **3.9a**, que presenta un grupo NH<sub>2</sub> en la posición 7, resultó ser diez veces menos activo que el compuesto prototipo. También el derivado de purina **3.13a**, con un CH en la posición 2, fue seis veces menos activo que el derivado de triazoloimidazopirimidinona **3.8**, mientras que el resto de los compuestos sintetizados fueron inactivos.

**Taba 3.1.** Actividad antiviral, citotoxicidad e índice de selectividad de **3.9a,b-3.11** y **3.13a-b**.

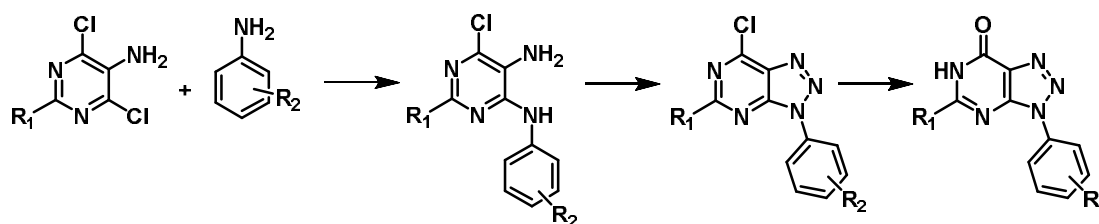
Compuestos	Nº	CE <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	CE <sub>90</sub> (µM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup>	IS <sup>d</sup>
	<b>3.9a</b>	225 ± 33	309 ± 48	>746	>3
	<b>3.9b</b>	>553	>553	553	-
	<b>3.10</b>	>706	>706	>706	-
	<b>3.11</b>	>706	>706	>706	-
	<b>3.13a</b>	127 ± 10	161 ± 27	491	4
	<b>3.13b</b>	>703	>703	>703	-
	<b>3.8</b>	<b>19 ± 2</b>	<b>38 ± 16</b>	<b>&gt;743</b>	<b>&gt;39</b>
	<b>cloroquina</b>	<b>11 ± 7</b>		<b>89 ± 28</b>	<b>8.1</b>

a: CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50.b: CE<sub>90</sub> o concentración efectiva 90.c: CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.d: IS o índice selectivo, es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>.

Estos datos apuntan a requisitos estructurales bastante estrictos en las posiciones 2, 6 y 7 del heterociclo para la actividad frente al CHIKV que incluyen la importancia del anillo de triazol, la no sustitución del NH en la posición 6 y un grupo ceto en la posición 7.

#### 4.2. Modificaciones en el anillo aromático

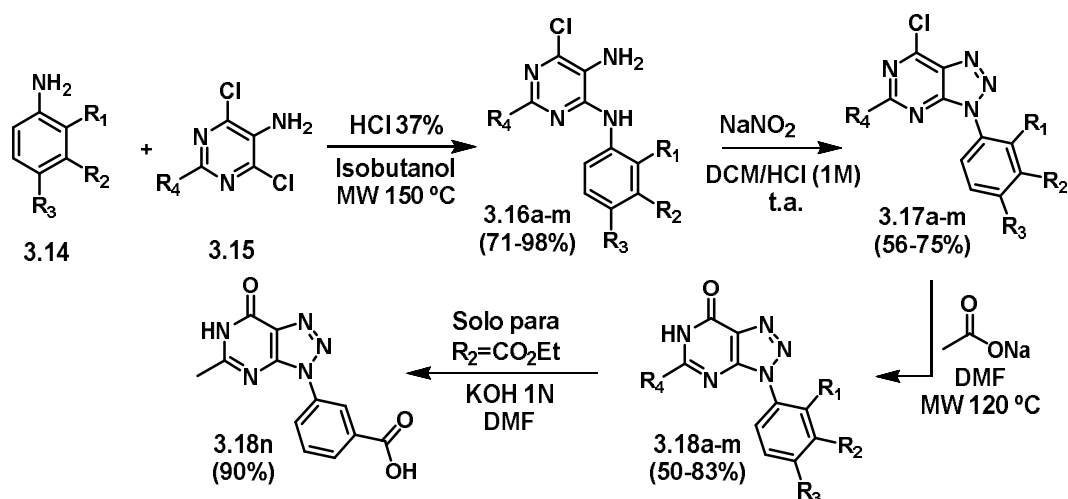
La segunda serie de modificaciones se realizaron sobre el anillo aromático del cabeza de serie **3.8**. Para ello se empleó la ruta descrita en el esquema 3.4, que ya se había puesto a punto en el grupo para la síntesis del compuesto **3.7**.<sup>40</sup>



Esquema 3.4

El primer paso consiste en la formación de las 6-cloro-4,5-diaminopirimidinas a partir de 4,6-dicloropirimidinas y anilinas mediante catálisis ácida por calentamiento al microondas. El empleo del calentamiento por microondas permite una reducción muy notable de los tiempos de reacción respecto a la calefacción convencional,<sup>40</sup> pasando de horas a minutos, así como una mejora en los rendimientos. Estas 6-cloro-4,5-diaminopirimidinas son intermediarios sintéticos muy versátiles permitiendo la síntesis de diferentes heterociclos.<sup>41,42</sup> En particular el tratamiento con  $\text{NaNO}_2$  en condiciones ácidas conduce a la formación de 7-cloro-3*H*-[1,2,3]-triazolo[4,5-*d*]pirimidinas. Por último, la transformación del cloro al grupo ceto se puede llevar a cabo con acetato sódico.

Así, la reacción de anilinas diferentemente sustituidas (**3.14**) con 4,6-dicloropirimidinas (**3.15**) en presencia de ácido clorhídrico concentrado en isobutanol por calentamiento al microondas a 150 °C durante 10-30 minutos condujo a los compuestos **3.16a-m** con rendimientos muy buenos (71-98%) (Esquema 3.5). En muchos casos, los productos se aislaron del medio de reacción por filtración y se utilizaron directamente para el segundo paso. En el caso del compuesto **3.16m** ( $\text{R}_2 = \text{COOEt}$ ), se substituyó el isobutanol empleado como disolvente, por dioxano para evitar la transesterificación. A continuación, los productos **3.16a-m** se trataron con nitrito sódico en una mezcla de ácido clorhídrico 1N y diclorometano (1:1) para dar lugar a las 7-cloro-3*H*-[1,2,3]-triazolo[4,5-*d*]pirimidinas **3.17a-m** con rendimientos entre 56-75%, exceptuando el compuesto **3.17f** ( $\text{R}_2 = \text{NHCOCH}_3$ ) que se obtuvo por tratamiento con nitrito sódico en ácido acético para evitar la desacetilación de la acetamida. Finalmente, el tratamiento de los derivados clorados **3.17a-m** con acetato sódico en *N,N*-dimetilformamida dio lugar a los compuestos **3.18a-m** con rendimientos de moderados a buenos (50-83%).



Esquema 3.5

El compuesto **3.18m**, que presenta un grupo éster en posición *meta*, se trató adicionalmente con KOH 1N en *N,N*-dimetilformamida para generar el ácido correspondiente **3.18n**. Los rendimientos para cada uno de los tres pasos de síntesis así como los sustituyentes introducidos en el anillo aromático en esta serie se recogen en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Sustituyentes y rendimientos de los tres pasos de síntesis de los compuestos **3.16a-m** al **3.18a-n**




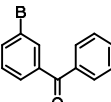




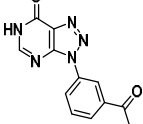
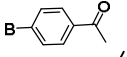
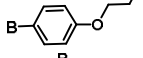

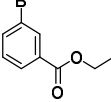


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	3.16 (%)	3.17 (%)	3.18 (%)
<b>a</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	98	75	50
<b>b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	95	75	54
<b>c</b>	H	Cl	H	CH <sub>3</sub>	93	65	77
<b>d</b>	H	COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	CH <sub>3</sub>	89	56	75
<b>e</b>	H	OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	71	61	71
<b>f</b>	H	NHCOCH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	62	70	35
<b>g</b>	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	98	27	81
<b>h</b>	H	CN	H	CH <sub>3</sub>	91	73	65
<b>i</b>	H	COCH <sub>3</sub>	H	H	66	77	59
<b>j</b>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	85	61	62
<b>k</b>	H	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	84	75	65
<b>l</b>	H	-OCH <sub>2</sub> O-		CH <sub>3</sub>	89	26	50
<b>m</b>	H	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	98	69	65
<b>n*</b>	H	COOH	H	CH <sub>3</sub>			92

\*sintetizado a partir del compuesto **3.18m** por hidrólisis básica

## Resultados y discusión

Los compuestos sintetizados fueron evaluados frente al virus chikungunya y en la tabla 3.3 se muestran los datos obtenidos. Se incluye además los datos del compuesto **3.8**, compuesto prototipo, que se ha empleado como referencia.

**Tabla 3.3.** Actividad antiviral, citotoxicidad e IS de los compuestos **3.18a-n**.

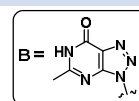
Compuestos	Nº	CE <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CE <sub>90</sub> (μM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	IS <sup>d</sup>
	<b>3.18a</b>	348 ± 36	460 ± 13	>777	>2
	<b>3.18b</b>	28 ± 6	179 ± 44	>777	>28
	<b>3.18c</b>	32 ± 11	235 ± 7	>764	>24
	<b>3.18d</b>	162 ± 15	>604	>604	>29
	<b>3.18e</b>	12 ± 4	156 ± 43	>701	>58
	<b>3.18f</b>	>261	>261	261	-
	<b>3.18g</b>	131 ± 11	187 ± 21	>793	>6
	<b>3.18h</b>	>740	>740	>740	-
	<b>3.18i</b>	>784	>784	>784	-
	<b>3.18j</b>	326 ± 37	>743	>743	>2
	<b>3.18k</b>	>701	>701	>701	-
	<b>3.18l</b>	>147	>147	>147	-
	<b>3.18m</b>	202 ± 38	>322	322	1.6
	<b>3.18n</b>	>515	>515	515	-
	<b>3.8</b>	<b>19 ± 2</b>	<b>38 ± 16</b>	<b>&gt;743</b>	<b>≥39</b>

a: CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50.

b: CE<sub>90</sub> o concentración efectiva 90.

c: CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.

d: IS o índice selectivo, es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>.





El primer rasgo a destacar de los datos recogidos en la tabla 3.3 es que hay varios compuestos (**3.18b-c** y **3.18e**) que muestran una actividad antiviral similar al prototipo, así como ausencia de citotoxicidad y en consecuencia tienen un buen índice de selectividad. En concreto, los compuestos que presentan una actividad antiviral semejante al compuesto patrón poseen en posición *meta* un grupo metoxi (**3.18b**), cloro (**3.18c**) o isopropoxi (**3.18e**). Por tanto, la naturaleza electroattractora o electrodonadora del sustituyente no parece tener un efecto determinante en la actividad. Sin embargo, cuando el grupo metoxi se encuentra en posición *orto* (**3.18a**), la actividad disminuye considerablemente con respecto a cuando se encuentra en posición *meta* (**3.18b**). De un modo similar, la sustitución con un grupo acetilo en *para* (**3.18j**) conduce a un compuesto casi 20 veces menos activo que cuando el mismo sustituyente está en posición *meta* (prototipo **3.8**). Igualmente otros éteres en *para* como el *n*-propoxi (**3.18k**) o el dioxolano (**3.18l**) resultaron inactivos. Cuando el grupo acetilo en *meta* en el compuesto prototipo **3.8** se sustituye por un grupo benzoilo (**3.18d**) la actividad antiviral también disminuye casi un orden de magnitud.

Otros sustituyentes en posición *meta* como acetamida (**3.18f**), dimetilamino (**3.18g**), ciano (**3.18h**) o carboxilato (**3.18n**) conducen a compuestos sin actividad significativa, o en el caso del éster **3.18m**, a una reducción muy notable de la actividad.

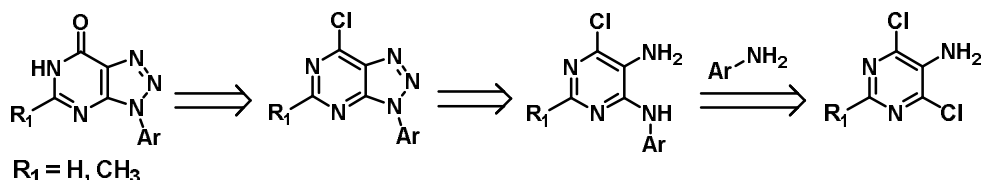
También cabe destacar la falta de actividad del compuesto **3.18i**, análogo al prototipo pero que presenta un hidrógeno en vez de un grupo metilo en la posición 5 del heterociclo, lo que parece indicar la importancia de las sustituciones en esta posición para la actividad.

Así, la evaluación de esta segunda serie de compuestos indica la importancia del metilo en la posición 5 de la base así como del sustituyente en el anillo aromático, obteniéndose los mejores resultados cuando éste es un grupo acetilo o isopropoxi en posición *meta*.

#### **4.3. Modificaciones en la posición 5 de la base heterocíclica**

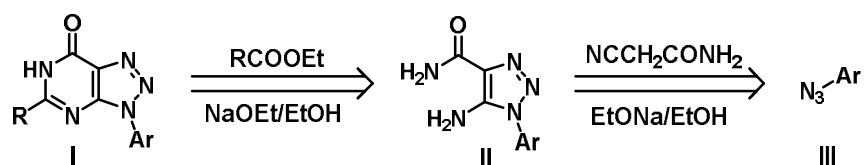
Puesto que los datos anteriores apuntaban a la importancia de la sustitución en la posición 5 del heterociclo para la actividad antiviral, la siguiente serie de modificaciones se centraron en esta posición. Según la ruta sintética que se había seguido hasta este momento, el sustituyente en posición 5 del heterociclo corresponde con el sustituyente en posición 2 de la dicloropirimidina de partida, y ya se habían sintetizado y evaluado compuestos donde ese R<sub>1</sub> eran H (inactivo) o metilo (activo). La introducción de otros sustituyentes en R<sub>1</sub> siguiendo esta misma ruta requería de la síntesis previa de estas

pirimidinas, dada la relativa escasez de 5-amino-4,6-dicloropirimidinas comerciales. Esta opción parecía poco atractiva ya que el sustituyente donde se quería explorar la diversidad se introduciría en los primeros pasos de la síntesis (Esquema 3.6).



Esquema 3.6

Por ello, parecía razonable abordar otra estrategia sintética que permitiera introducir este sustituyente variable en etapas tardías de la ruta sintética. En la bibliografía se ha descrito que las triazolopirimidin-7-onas (**I**) se pueden sintetizar a partir de derivados de 5-amino-1,2,3-triazolo-4-carboxamidas (**II**) que a su vez se pueden obtener por reacción de azidas (**III**) con cianoacetamida en medio básico (Esquema 3.7).<sup>43</sup> En esta ruta, el sustituyente en posición 5 de la triazolopirimidinona se introduce en el último paso y viene dado por el éster empleado para la reacción de ciclación. Por lo tanto, esta ruta parecía más adecuada para nuestro objetivo.



Esquema 3.7

Como se puede observar en el esquema 3.7, los dos pasos clave de esta nueva ruta requieren del empleo de etóxido sódico en etanol, y esto condicionó el sustituyente a elegir en el anillo aromático. Así, de entre los dos compuestos que habían presentado mejores valores de inhibición, la cetona **3.8** y el éter **3.18e**, se descartó la cetona presente en el compuesto de referencia (**3.8**), ya que podría dar problemas de reacciones secundarias por la formación de enolatos. Por esta razón se eligió como sustituyente para el anillo aromático el grupo isopropoxi (presente en **3.18e**) (Figura 3.12).

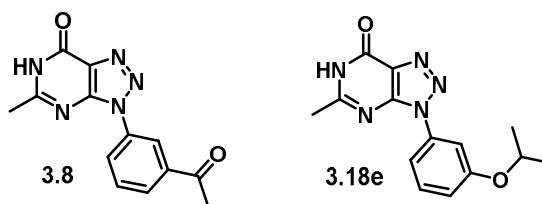
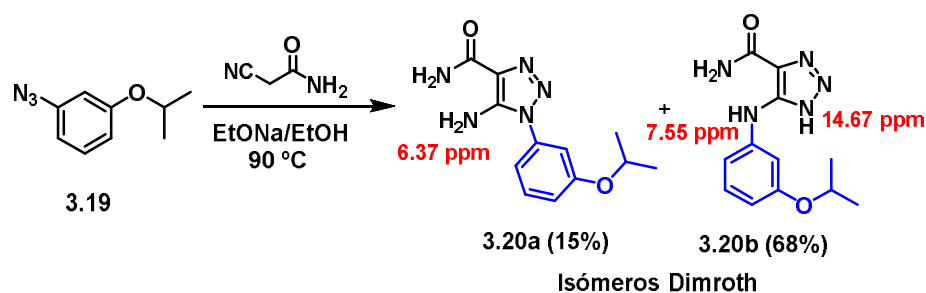


Figura 3.12

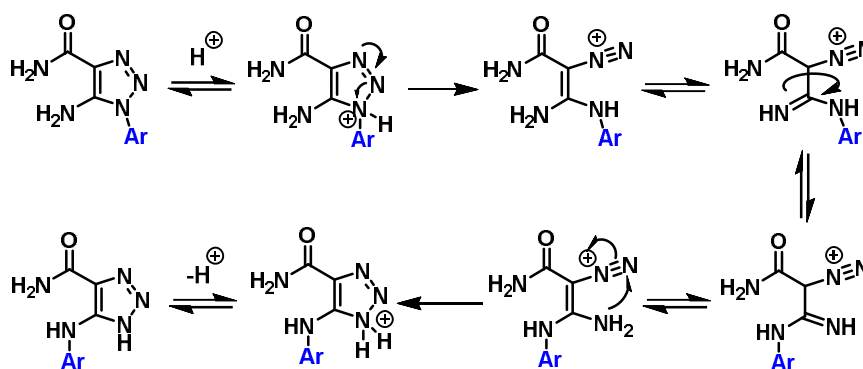
La síntesis de triazolopirimidinonas con el grupo isopropoxi en el anillo aromático requería como producto de partida la azida **3.19**, que se sintetizó a partir de la 3-isopropoxianilina siguiendo procedimientos descritos (Esquema 3.8).<sup>44</sup> El tratamiento de esta azida con cianoacetamida en las condiciones comúnmente empleadas en la bibliografía, es decir, etóxido sódico en etanol a 90 °C condujo a una mezcla de dos compuestos que por HPLC-MS presentaban el mismo peso molecular ( $m/z$  262). Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de estos compuestos mostraban algunas diferencias en los protones unidos a nitrógeno. El espectro del primero de los compuestos presentaba una única señal a 6.37 ppm que integraba para dos protones, y este compuesto fue asignado como el 5-amintriazol deseado (**3.20a**), ya que la señal a 6.37 ppm debía corresponder al grupo amino exocíclico. El espectro del otro producto mostraba dos señales muy bien diferenciadas a desplazamientos de 14.67 y 7.55 ppm que integraban para un protón cada una. La primera de estas señales, con un desplazamiento químico tan característico, parecía corresponder al protón de una amina de heterociclo, y se asignó al NH del anillo de triazol, mientras que el amino exocíclico que integraba para un único protón debía estar sustituido por el arilo. Así, a este segundo compuesto se le asignó la estructura **3.20b** (Esquema 3.8). Por tanto, empleando las condiciones descritas, se obtenía de forma minoritaria (15%) el isómero que se buscaba (**3.20a**).



Esquema 3.8

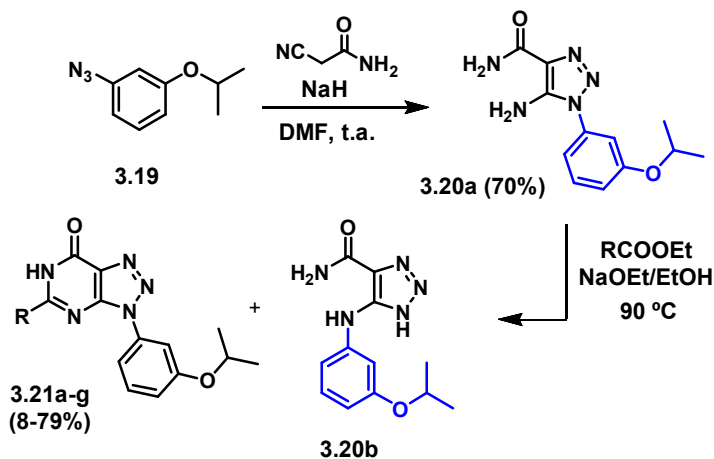
La transposición donde los nitrógenos endo y exocíclicos intercambian su posición en anillos nitrogenados está documentada en la bibliografía y se denomina transposición Dimroth.<sup>45,46</sup> En particular en derivados de 5-amino-1,2,3-triazoles existen algunos

precedentes, destacando el trabajo publicado por Baines y col.,<sup>47</sup> donde se propone el mecanismo para esta transposición aplicada a 1,2,3-triazoles, y que se recoge en el esquema 3.9. El mecanismo propuesto plantea una primera etapa de protonación en N-1 seguida de apertura del anillo para dar la sal de diazonio, dejando una enamina acíclica que tautomeriza a la forma imina permitiendo la rotación del enlace C-C. Una nueva tautomerización a la enamina menos impedida favorecería el cierre del anillo que, tras la pérdida del protón, conduciría al isómero donde el anillo aromático se sitúa en el grupo amino exocíclico (Esquema 3.9).



Esquema 3.9

Si, conforme a esta secuencia, el primer paso para que ocurra la transposición requiere de la protonación del anillo de triazol, se podría intentar minimizar esta transposición sustituyendo el disolvente polar prótico empleado (EtOH) por un disolvente polar aprótico. De este modo se llevó a cabo la reacción de la azida **3.19**<sup>44</sup> con cianoacetamida en DMF anhidra, empleando NaH como base y a temperatura ambiente. Con estas condiciones se obtuvo exclusivamente el compuesto **3.20a** con un 70% de rendimiento (Esquema 3.10).



Esquema 3.10

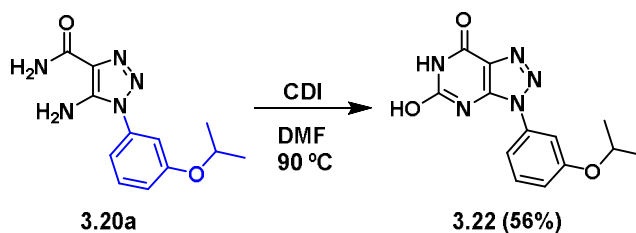
Una vez obtenida la 5-amino-4-carboxamida **3.20a**, se procedió al tratamiento con diferentes ésteres en las condiciones descritas en la bibliografía,<sup>48,49</sup> es decir, etóxido sódico en etanol a 90 °C obteniéndose los compuestos ciclados **3.21a-g** (Esquema 3.10) con los rendimientos que se reflejan en la tabla 3.4 y detectándose en proporciones variables la formación del isómero Dimroth **3.20b**.

**Tabla 3.4.** Rendimientos para la reacción de ciclación de los compuestos **3.21a-g**

Compuestos	R	Rto (%)
<b>3.21a</b>	CF <sub>3</sub>	67
<b>3.21b</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	53
<b>3.21c</b>	CH <sub>2</sub> CN	23
<b>3.21d</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	24
<b>3.21e</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8
<b>3.21f</b>	Ph	41
<b>3.21g</b>	4-py	79

Como se puede observar, si bien ha sido posible introducir tanto sustituyentes alifáticos como aromáticos, los rendimientos son variables. Desde el punto de vista experimental se observa que cuando la reacción de ciclación es rápida, los rendimientos son buenos, mientras que cuando la reacción de ciclación es lenta, se produce la trasposición al isómero Dimroth no deseado, y de este modo los rendimientos de los productos ciclados bajan.

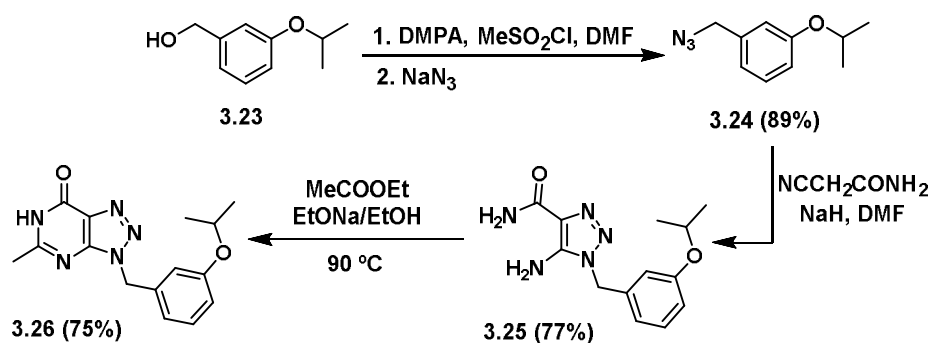
Por otro lado, la aminocarboxamida **3.20a** podría ser utilizada para otras reacciones de cierre de anillo. De hecho, el tratamiento de **3.20a** con ciclohexilcarbodiimida en DMF a 90 °C condujo a la triazolopirimidin-5,7-diona **3.22** con un 56% de rendimiento (Esquema 3.11).



**Esquema 3.11**

Otro de los objetivos era la variación del nexo de unión entre el N-3 del heterociclo y el anillo aromático incorporando un metileno entre ellos. Para ello, partiendo del alcohol **3.23** se llevó a cabo la mesilación que tras posterior tratamiento con azida sódica condujo al compuesto **3.24** con un 89% de rendimiento. Esta azida se hizo reaccionar

con cianoacetamida y NaH en DMF para formar el triazol **3.25** con un 77% de rendimiento. La ciclación con acetato de etilo en medio básico condujo al compuesto **3.26** con un 75% de rendimiento (Esquema 3.12).<sup>50</sup> En este caso no se observó la formación del isómero Dimroth debido al efecto estabilizante del grupo bencilo.<sup>43,51</sup>



Esquema 3.12

Esta serie de compuestos diferentemente sustituidos en la posición 5 del heterociclo (**3.21a-g** y **3.22**), junto con el compuesto bencilado **3.26**, fueron evaluados frente a la replicación del virus chikungunya. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.5 en la que se incluye el compuesto de referencia **3.18e**.

Tabla 3.5. Actividad antiviral, citotoxicidad e IS de los compuestos **3.21a-g**, **3.22** y **3.26**.

	R	Nº	CE <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	CE <sub>90</sub> (µM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup>	IS <sup>d</sup>
	CF <sub>3</sub>	<b>3.21a</b>	66 ± 1	>118	118	2
	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>3.21b</b>	3 ± 1	9 ± 6	>134	>45
	CH <sub>2</sub> CN	<b>3.21c</b>	115 ± 16	>296	296	3
	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<b>3.21d</b>	>218	>218	218	-
	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<b>3.21e</b>	>285	>285	285	-
	Ph	<b>3.21f</b>	227 ± 21	>372	372	2
	4-py	<b>3.21g</b>	83 ± 5	>113	113	1
	OH	<b>3.22</b>	>696	>696	>696	-
		<b>3.26</b>	167 ± 10	232 ± 62	>872	>5
		<b>3.18e</b>	12 ± 4	156 ± 43	>701	>58

a: CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50.

b: CE<sub>90</sub> o concentración efectiva 90.

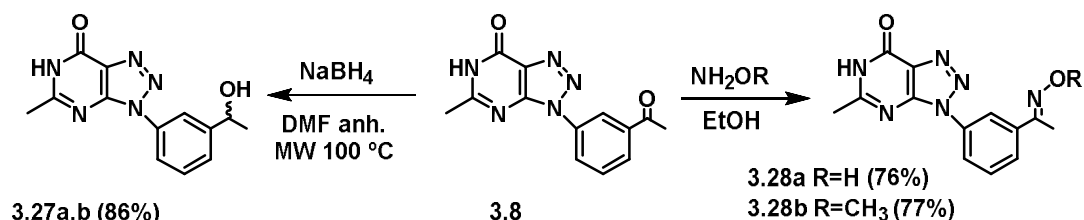
c: CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.

d: IS o índice selectivo, es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>.

Los compuestos **3.21a**, **3.21c-g** y **3.22**, muestran una disminución en la actividad antiviral respecto al prototipo. Sin embargo el compuesto **3.21b**, que presenta un etilo como sustituyente en la posición 5, presentó mejores valores de  $CE_{50}$  y de  $CE_{90}$  que el cabeza de serie y además mostró un buen índice de selectividad. Sin embargo, el aumento en la longitud de la cadena (**3.21d**,  $R = nPr$ ) o su ramificación (**3.21e**,  $R = iPr$ ), condujo a compuestos totalmente inactivos. Por otra parte, la incorporación de un metileno entre la base y el sustituyente aromático (**3.26**) se traduce en una disminución de más de un orden de magnitud en la actividad antiviral respecto al compuesto de referencia **3.18e**.

#### 4.4. Modificaciones en el grupo acetilo del cabeza de serie 3.8

Paralelamente al apartado anterior, se realizaron algunas modificaciones sobre el acetilo del compuesto prototipo **3.8** (Esquema 3.13). En concreto, se procedió a la reducción del grupo carbonilo por tratamiento de **3.8** con borohidruro sódico en DMF anhidra obteniéndose los alcoholes **3.27a,b** como mezcla de enantiómeros con un 72% de rendimiento. Igualmente se llevó a cabo la conversión del grupo carbonilo a oximas. Para ello, el compuesto **3.8** se trató con hidroxilamina o metoxilamina en etanol por calentamiento al microondas a 80 °C durante 1 h dando lugar a la oxima **3.28a** y a la metiloxima **3.28b** con rendimientos del 76 y 77% respectivamente.



Esquema 3.13

En los espectros de  $^1\text{H}$  RMN de **3.28a** y de **3.28b** se observó la existencia de un único isómero. Para determinar la configuración de estas oximas se hicieron experimentos de NOESY y NOE selectivo. Así, para la oxima **3.28a** se observa NOE entre el hidrógeno del OH y el metilo contiguo. Además se observa NOE entre el metilo de la oxima y el H-2', así como NOE de ese metilo con el H-4' del anillo aromático. Estos NOEs son compatibles con una configuración *E* de la oxima e indican que existe libertad de giro en el enlace que une al anillo aromático con la oxima (Figura 3.13).

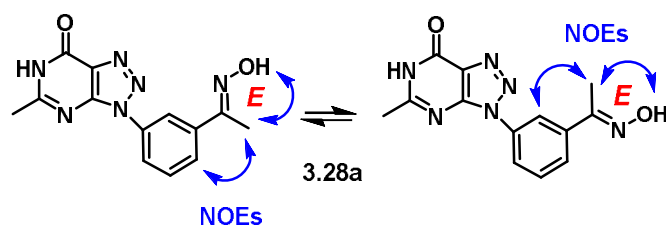


Figura 3.13

En el caso de la oxima **3.28b**, se observó NOE entre el metilo del metoxilo y el metilo de la oxima que permitiría la asignación de la configuración de dicha oxima como *E*. Al igual que en el caso anterior, la existencia de NOEs entre el metilo de la oxima tanto con el H-2' como con el H-4' del anillo aromático, indican la libertad de giro entre el anillo aromático y la oxima (Figura 3.14).

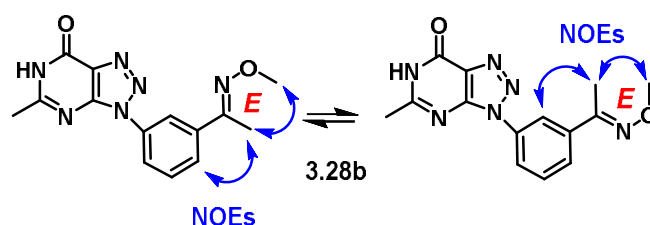


Figura 3.14

Los datos de la evaluación antiviral de estos compuestos son los que se recogen en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6.** Actividad antiviral, citotoxicidad e IS de los compuestos **3.27a,b** y **3.28a-b**.

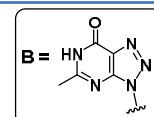
Compuestos	Nº	CE <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	CE <sub>90</sub> (μM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	IS <sup>d</sup>
	<b>3.27a,b</b>	17 ± 7	41 ± 19	>737	>43
	<b>3.28a</b>	56 ± 19	117 ± 46	>704	>13
	<b>3.28b</b>	24 ± 14	87 ± 60	>670	>28
	<b>3.8</b>	<b>19 ± 2</b>	<b>38 ± 16</b>	<b>&gt;743</b>	<b>&gt;39</b>

a: CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50.

b: CE<sub>90</sub> o concentración efectiva 90.

c: CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.

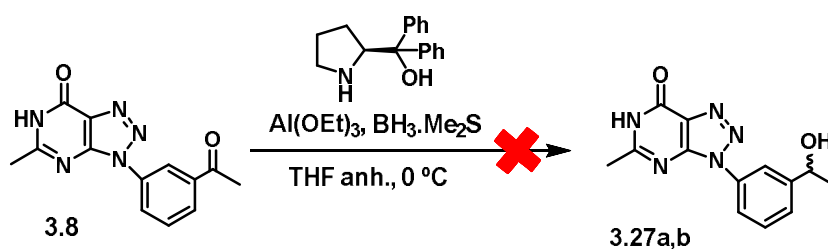
d: IS o índice selectivo, es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>.





Todos los derivados sintetizados en este apartado muestran actividad antiviral significativa. Además, cabe destacar que estos derivados no presentan citotoxicidad y muestran un buen índice de selectividad. Tanto la mezcla de alcoholes **3.27a,b**, como la metiloxima **3.28b**, presentan valores de  $CE_{50}$  del mismo orden que el prototipo, por lo que estos compuestos fueron objeto de nuevas modificaciones.

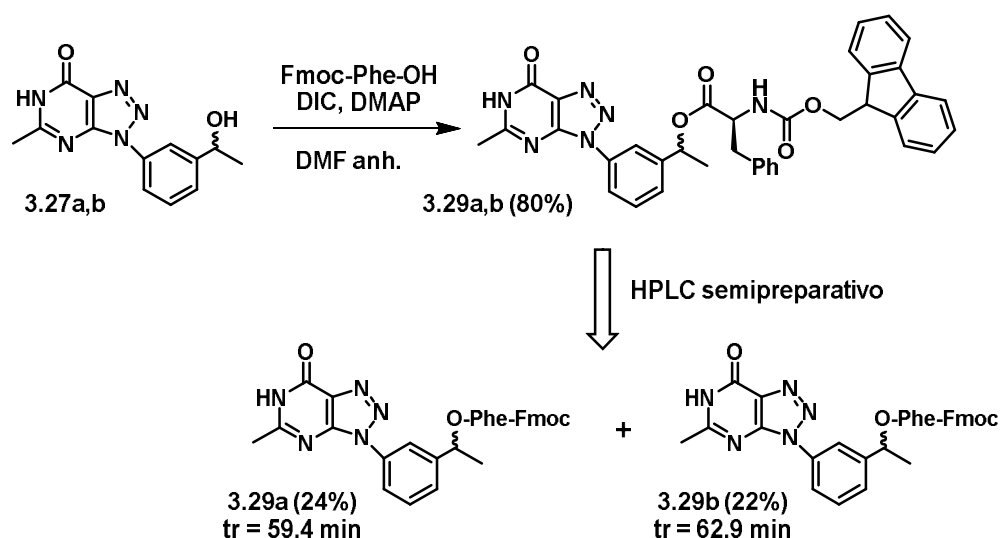
Puesto que la mezcla racémica **3.27a,b** mostró actividad anti-CHIKV similar a la del compuesto prototipo **3.8**, se planteó obtener y evaluar individualmente cada uno de los dos enantiómeros. El primer intento consistió en una reducción enantioselectiva de la cetona presente en el compuesto de referencia (**3.8**) empleando el catalizador de Corey-Itano.<sup>52,53</sup> En este sentido, resultaba interesante la aportación de Masui y Shioiri quienes habían propuesto generar este catalizador *in situ*.<sup>54</sup> Además, un estudio posterior de Kamijo y col. concluía que el empleo de trietóxido de aluminio permitía acortar los tiempos de reacción, mejorar los excesos enantioméricos y los rendimientos de la reacción.<sup>55</sup> Así, se hizo reaccionar la cetona **3.8** con el catalizador de oxazaborolidina generado *in situ* en presencia de  $Al(OEt)_3$  a 0 °C en THF anhidro (Esquema 3.14). Sin embargo, tras varias horas la cetona permanecía inalterada.



Esquema 3.14

Se llevó a cabo la reducción en las mismas condiciones pero empleando DMF anhidra, ya que era el disolvente que se había empleado anteriormente para la reducción de la cetona a la mezcla de enantiómeros, pero no se observó conversión alguna. Se realizaron otros experimentos modificando la temperatura (temperatura ambiente, 40 °C, 70 °C y 100 °C). Solamente cuando se calentó a 100 °C por irradiación al microondas se observó la reducción de la cetona. Sobre el producto de reacción de la reducción, se realizaron estudios de  $^1H$  RMN empleando sales de europio ( $Eu(fod)_3$ )<sup>56</sup> para determinar la riqueza enantiomérica de la mezcla de alcoholes obtenida (**3.27a,b**), estableciéndose una relación 3:2. Esta baja enantioselectividad quizás podría deberse a la necesidad de aplicar altas temperaturas para que se produzca la reacción de reducción.

El segundo intento para obtener cada enantiómero consistió en practicar la reducción de la cetona con  $\text{NaBH}_4$  en DMF en el microondas y posteriormente derivatizar la mezcla de enantiómeros **3.27a,b** transformándolos en una mezcla de diastereómeros (Esquema 3.15). Como es bien sabido, los diastereoisómeros tienen propiedades físicas y espectroscópicas diferentes, y esto permitiría su separación y la determinación de su configuración absoluta. De las varias derivatizaciones posibles, se eligió esterificar la mezcla de enantiómeros con un derivado de (L)-fenilalanina-*N*-protegido. Así, se llevó a cabo el acoplamiento de **3.27a,b** con Fmoc-Phe-OH empleando PyBOP y TEA en diclorometano a temperatura ambiente durante toda la noche, pero el producto de partida permanecía inalterado. Se ensayaron otros agentes de acoplamiento más potentes, como HCTU y HATU, sin éxito. Finalmente, la reacción de **3.27a,b** con el anhídrido de fenilalanina, previamente formado por reacción de Fmoc-Phe-OH con DIC, en DMF anhidra condujo a los productos de acoplamiento **3.29a,b** con un 80% de rendimiento. Esta mezcla de diastereómeros se separó empleando HPLC semipreparativo obteniéndose los compuestos **3.29a** y **3.29b** con rendimientos del 24% y 22% respectivamente.



Esquema 3.15

Para determinar la configuración de estos diastereoisómeros se registraron y compararon sus espectros de  $^1\text{H}$  RMN. Por analogía a la derivatización que se hace con el ácido de Mosher,<sup>56</sup> se consideró un plano que contenía  $\text{ArMeC(H)-O-C(=O)-C(H)BnNH-Fmoc}$  (Figura 3.15). De este modo, cuando el metilo (Me) y el grupo bencilo (Bn) estuvieran en la misma cara, los protones del grupo metilo quedarían más apantallados y por tanto tendrían un menor desplazamiento químico. Este efecto se vio en el isómero de mayor movilidad cromatográfica **3.29a** (tr = 59.4 min,  $\delta$  = 1.55 ppm),

que tentativamente se asignó con la configuración (*R,S*). Por el contrario, si el metilo (Me) estuviera en la cara opuesta del grupo bencilo (Bn), los protones del grupo Me no sufrirían el apantallamiento del grupo Bn y por tanto tendrían un mayor desplazamiento químico. Este efecto se vio en el isómero de menor movilidad cromatográfica **3.29b** (tr = 62.9 min,  $\delta$  = 1.62 ppm), al que se asignó la configuración (*S,S*).

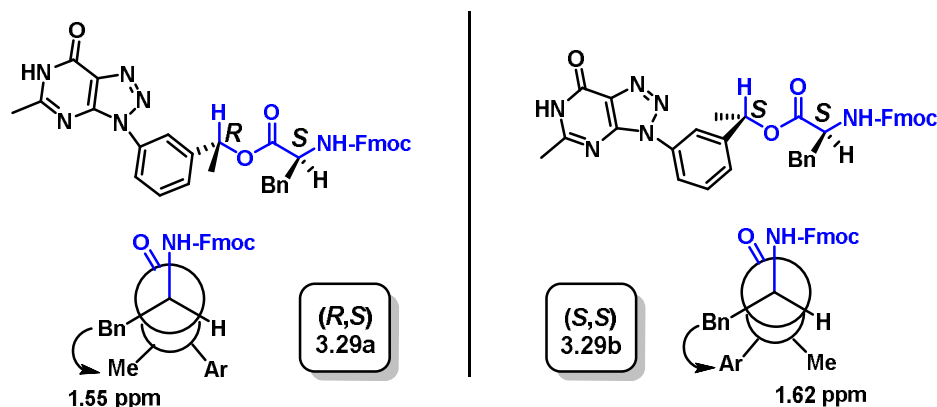
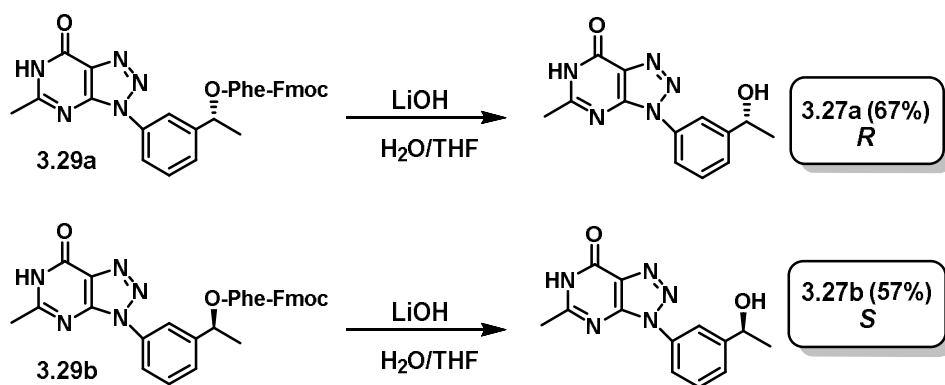


Figura 3.15

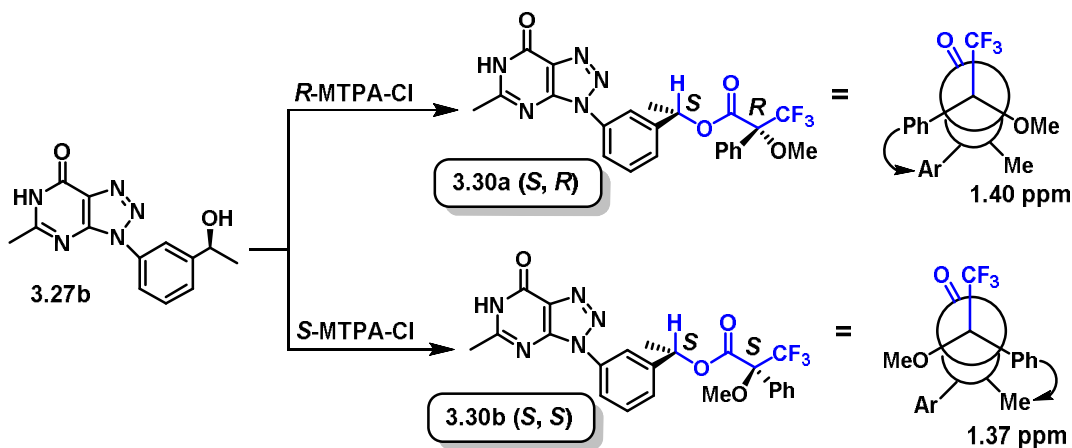
Posteriormente, los compuestos **3.29a** y **3.29b** se trataron individualmente con LiOH en una mezcla de H<sub>2</sub>O/THF obteniéndose los alcoholes correspondientes **3.27a** y **3.27b** con un 67% y 57% de rendimiento, respectivamente (Esquema 3.16).



Esquema 3.16

Para confirmar la configuración propuesta, se derivatizó el compuesto **3.27b** con los cloruros de ácido de Mosher *R* y *S* (*R*-MTA-Cl y *S*-MTA-Cl) en piridina deuterada (Esquema 3.17).<sup>56</sup> Se registraron los espectros de <sup>1</sup>H RMN y se compararon de nuevo los desplazamientos del grupo metilo (Me) respecto del fenilo (Ph) del ácido de Mosher. El producto derivatizado con el enantiómero *R*-MTA-Cl (**3.30a**) mostró un menor apantallamiento del grupo metilo ( $\delta$  = 1.40 ppm) que el producto resultante de la

esterificación con el enantiómero S-MTA-Cl (**3.30b**) ( $\delta = 1.37$  ppm). Los resultados obtenidos permiten confirmar la asignación de **3.27b** como el enantiómero S, asignación que se había realizado de modo tentativo al derivatizar con Fmoc-Phe-OH.

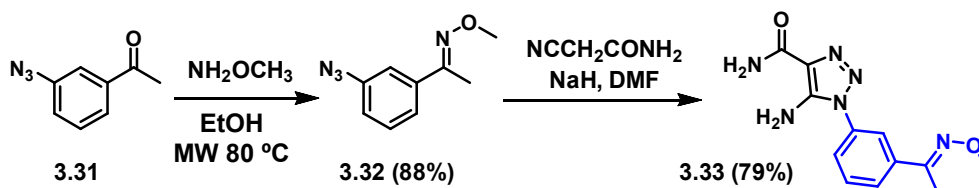


Esquema 3.17

Los enantiómeros **3.27a** y **3.27b** han sido enviados para su evaluación frente a la replicación de CHIKV, pero aún no se dispone de los resultados.

#### 4.5. Modificaciones en el compuesto 3.28b

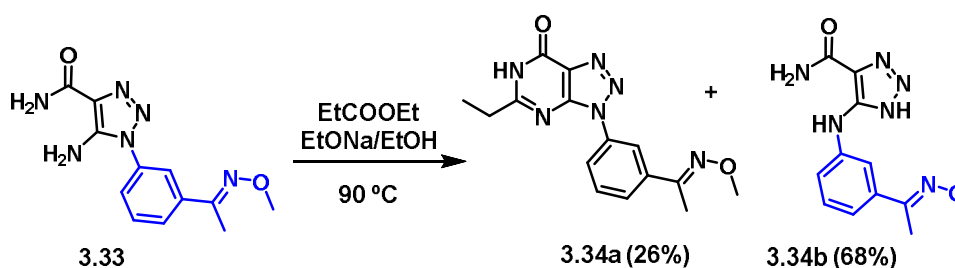
Otro de los compuestos que había mostrado un valor de  $CE_{50}$  similar al del prototipo **3.8** había sido la metiloxima **3.28b** (ver tabla 3.6). Este compuesto resultaba interesante por dos motivos: desde el punto de vista de la actividad antiviral, podría ser objeto de modificaciones adicionales, por ejemplo en la posición 5 del heterociclo, puesto que el sustituyente en el anillo aromático mantenía una buena actividad antiviral; desde el punto de vista químico, la metiloxima podría ser considerada una “cetona enmascarada” de modo que se podrían estudiar sustituciones en el heterociclo y en el último paso revertir la oxima a cetona. Con esta doble intención, se procedió a la síntesis de la carboxamida **3.33** (Esquema 3.18).



Esquema 3.18

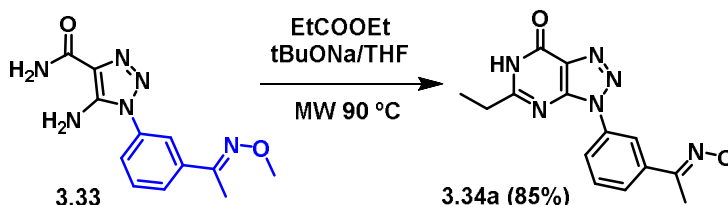
El tratamiento de la cetona **3.31**, obtenida a partir de la 3-acetilanilina siguiendo procedimientos descritos,<sup>57</sup> con hidroxilamina en etanol por irradiación al microondas a 80 °C durante 1 h permitió obtener el compuesto **3.32** con un 88% de rendimiento.<sup>43</sup> La azida **3.32** se hizo reaccionar con cianoacetamida en presencia de NaH en DMF, obteniéndose el triazol **3.33** con un buen rendimiento (79%).

Una vez obtenida la carboxamida **3.33** se procedió al tratamiento con propionato de etilo en etóxido sódico/etanol a 90 °C durante 1h, obteniéndose el compuesto deseado **3.34a** con bajo rendimiento. En estas condiciones se observó la formación del producto de trasposición (**3.34b**) en una proporción muy significativa, junto al producto ciclado deseado (Esquema 3.19).



Esquema 3.19

Esto condujo a modificar las condiciones de reacción para la ciclación. Para evitar o minimizar la protonación en N-1 que favorecería la trasposición Dimroth no deseada, se propuso un cambio en el disolvente de la reacción, sustituyendo el disolvente polar prótico (EtOH) por un disolvente polar no prótico (THF). Además, se sustituyó la base, EtONa, por una base más fuerte (<sup>t</sup>BuOK) para favorecer la reacción de ciclación. Así, empleando THF como disolvente y <sup>t</sup>BuOK como base se hizo reaccionar el compuesto **3.33** con propionato de etilo calentando en el microondas a 90 °C durante 1 hora. Con este procedimiento se obtuvo la oxima **3.34a** con un 85% de rendimiento (Esquema 3.20).



Esquema 3.20

En los espectros de <sup>1</sup>H RMN del compuesto **3.34a** se observó la existencia de un único isómero. Los experimentos de NOESY y NOE selectivo mostraron NOE entre el

metilo del metoxilo y el metilo de la oxima que permitía la asignación de la configuración de dicha oxima como *E*. Además, la existencia de NOEs entre el metilo de la oxima tanto con el H-2' como con el H-4' del anillo aromático, indican la libertad de giro entre el anillo aromático y la oxima (Figura 3.16).

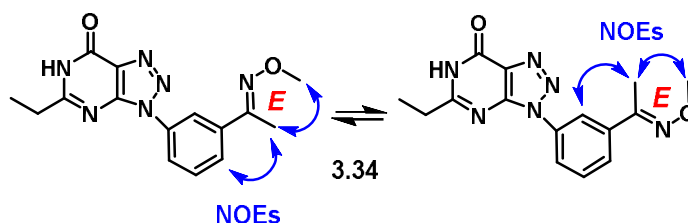
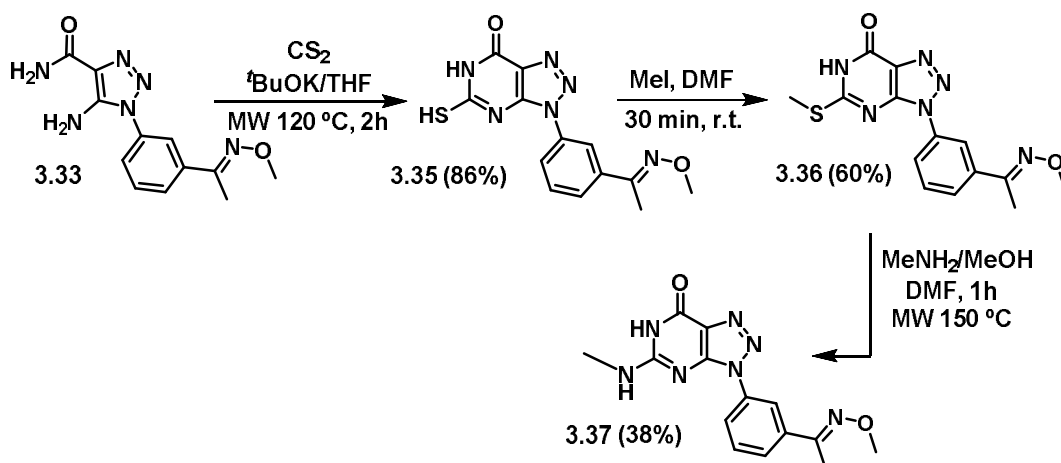


Figura 3.16

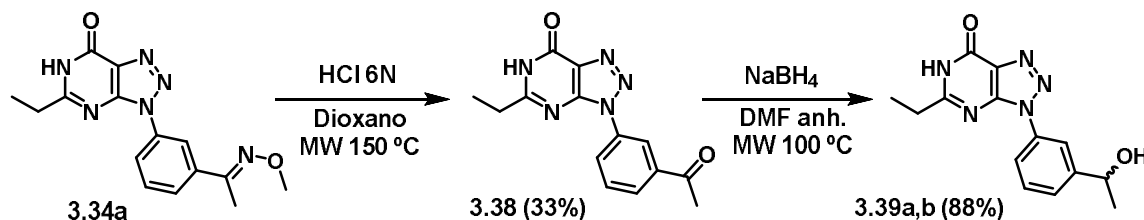
La carboxamida **3.33** permitía otras reacciones de cierre de anillo. Así, la 4-amino-5-carboxamida **3.33** se trató con disulfuro de carbono empleando  $t$ BuOK en THF obteniéndose la tioxantina correspondiente, **3.35**, con un 86% de rendimiento. El tratamiento de **3.35** con yoduro de metilo en ausencia de base en DMF dio lugar al producto **3.36** con un 60% de rendimiento. Adicionalmente el tratamiento de **3.36** con metilamina en metanol empleando DMF como codisolvente y por calentamiento al MW a 150 °C permitió obtener el compuesto **3.37** con un 38% de rendimiento (Esquema 3.21).



Esquema 3.21

Como se ha comentado, la oxima puede ser considerada una “cetona enmascarada”. Así, una vez obtenido el compuesto **3.34a**, se planteó la hidrolisis de la oxima a la correspondiente cetona así como la reducción de ésta a la mezcla racémica de alcoholes. De esta manera se podrían combinar los mejores sustituyentes en el anillo aromático con la presencia del etilo en la posición 5 de la base heterocíclica (Esquema

3.22). El tratamiento de **3.34a** con ácido clorhídrico 6N en dioxano por irradiación al microondas a 150 °C durante 1.5 h dio lugar al compuesto **3.38** con un 33% de rendimiento. Finalmente, el compuesto **3.38** se redujo con NaBH<sub>4</sub> en DMF anhidra a 100 °C en el microondas durante 30 min obteniéndose el compuesto **3.39a,b** como mezcla de alcoholes enantiómeros con excelente rendimiento.



Esquema 3.22

Los compuestos **3.34-3.39** fueron enviados para su evaluación frente a CHIKV, pero aún no se dispone de algunos datos. En la tabla 3.8 se recogen los datos disponibles así como, los del y compuesto prototipo **3.8**, y los del compuesto **3.21b** como referencia.

Tabla 3.7. Actividad antiviral, citotoxicidad e índice de selectividad de los compuestos **3.34a-3.39**

Nº	CE <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	CE <sub>90</sub> (µM) <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup>	IS <sup>d</sup>
<b>3.34a</b>	4 ± 1	5 ± 1	>274	>69
<b>3.35</b>	>265	>265	>265	-
<b>3.36</b>	> 56	>56	56	-
<b>3.37</b>	26 ± 3	> 84	84	3
<b>3.21b</b>	3 ± 1	9 ± 6	>134	>45
<b>3.8</b>	<b>12 ± 4</b>	<b>156 ± 43</b>	<b>&gt;701</b>	<b>&gt;58</b>

a: CE<sub>50</sub> o concentración efectiva 50.

b: CE<sub>90</sub> o concentración efectiva 90.

c: CC<sub>50</sub> o concentración citotóxica 50.

d: IS o índice selectivo, es el cociente entre CC<sub>50</sub> y CE<sub>50</sub>.

Como se recoge en la tabla 3.7, los compuestos **3.35** y **3.36** fueron inactivos frente a CHIKV mientras que el compuesto **3.37** mostró cierta actividad frente a CHIKV, pero la relación CE<sub>50</sub>/CC<sub>50</sub> de este compuesto muestra un bajo índice de selectividad. Sin embargo la oxima **3.34a** mostró valores de CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub> muy similares a los del derivado **3.21b**, acompañado de una ligera disminución de la citotoxicidad y con ello se consigue un mejor índice de selectividad.

#### 4.6. Estudios biológicos del cabeza de serie (3.8)

En paralelo al programa de química médica para la mejora de la actividad antiviral de las triazolopirimidinonas, se han realizado distintos estudios encaminados a establecer su mecanismo de acción antiviral, empleando el cabeza de serie inicial **3.8**. Estos estudios se han realizado en el grupo del Dr. Johan Neyts en el Instituto Rega de la Universidad de Lovaina. Así, se evaluó su actividad frente a otros miembros representativos del género de los alfavirus. En concreto se ensayó el compuesto **3.8** frente a la replicación del virus Sindbis, y del virus del bosque Semliki, en ambos casos empleando cultivos de células Vero. No se detectó actividad antiviral significativa frente a estos otros alfavirus. Por tanto, el compuesto **3.8** presenta un perfil antiviral selectivo frente a chikungunya. Indirectamente esta falta de actividad frente a virus del mismo género que también se cultivan en células Vero (como CHIKV) sugiere que la actividad anti-CHIKV de **3.8** implica una diana viral y no una diana celular. Esta selectividad de acción es muy deseable en un compuesto antiviral.

Además, para tener una idea preliminar sobre en qué etapa del ciclo replicativo del virus CHIK podría estar actuando esa familia de compuestos, se han realizado experimentos de tiempos de adición. Estos experimentos permiten determinar cuánto tiempo se puede posponer la adición del compuesto al cultivo hasta que pierde su acción antiviral considerando que la replicación del virus está “sincronizada” (Figura 3.17).

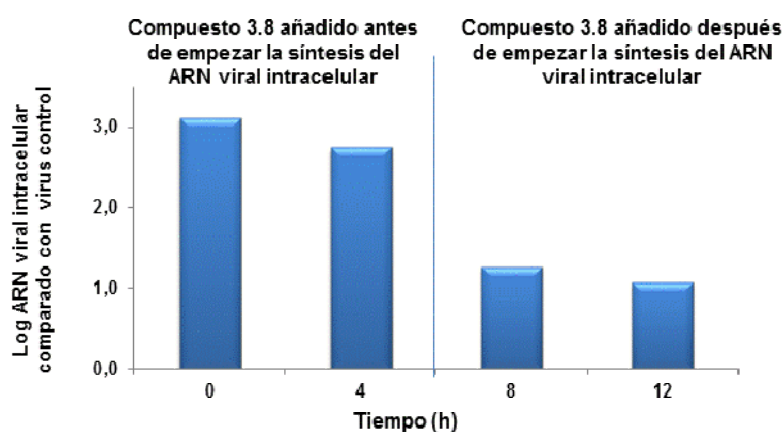


Figura 3.17

Así, en el caso del CHIKV, la síntesis del ARN viral en estos experimentos comienza 6 horas después de la infección. Como se muestra en la figura 3.17, la actividad anti-CHIKV de **3.8** (93  $\mu$ M) se mantiene cuando se adiciona al cultivo hasta 4 h después de



la infección. Sin embargo, si la adición se realiza tras 8 h, la eficacia antiviral se reduce significativamente. Estos resultados permiten excluir como dianas aquellas involucradas en las primeras etapas del ciclo replicativo, y apuntan hacia dianas implicadas en la replicación del material genético.

Actualmente se está realizando la selección de cepas virales resistentes a **3.8**. De la secuenciación de estas cepas y posterior creación del virus recombinante se podrá obtener una idea más precisa de la diana molecular de estas triazolopirimidin-7-onas.



## 5. CONCLUSIONES

Es evidente que la globalización conlleva al desarrollo de enfermedades más allá de su entorno habitual exponiendo poblaciones no inmunizadas a virus patógenos. Además, la capacidad de adaptación del agente patógeno a nuevos vectores puede conducir a nuevos brotes epidémicos de proporciones difíciles de prever. La fiebre chikungunya supone un buen ejemplo. Aunque la mortalidad asociada a este virus aún es baja, los cuadros clínicos son muy incapacitantes con repercusiones económicas graves. Por tanto es necesario trabajar en la identificación de compuestos que puedan frenar la replicación viral y eventualmente disponer de un tratamiento antiviral eficaz.

Mediante un programa de cribado de distintas familias de compuestos frente a la replicación del CHIKV se identificó la 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona con un arilo en posición 3 (**3.8**) como un cabeza de serie interesante.

En este capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de una batería de compuestos a partir del prototipo **3.8** empleando diferentes aproximaciones sintéticas. Las 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-onas se han sintetizado a partir de reacción de anilinas con 4,6-dicloropirimidinas, posterior reacción de las pirimidin-4,5-diaminas con NaNO<sub>2</sub> e hidrólisis del 7-Cl al grupo ceto, o alternativamente a partir de arilazidas, reacción con cianoacetamida y cierre de anillo con distintos ésteres. Esta segunda ruta ha requerido de la puesta a punto de ciertas condiciones de reacción.

Todos los compuestos sintetizados se han evaluado frente a células Vero infectadas con el virus de chikungunya. Las relaciones estructura-actividad se pueden resumir en los siguientes puntos:

- La necesidad de un sustituyente en la posición *meta* en el anillo aromático, siendo los grupos acetilo, isopropoxi y 1-(metoxiimino)etilo los que mejores datos de actividad han mostrado.
- La presencia del grupo carbonilo en la posición 7 del heterociclo es necesario para la actividad.
- El sustituyente etilo es el preferido en la posición 5 del heterociclo.
- El anillo de triazol es importante para la actividad.
- La incorporación de un grupo metileno como espaciador entre el anillo de triazol y el anillo aromático da lugar a una pérdida de actividad.

## Conclusiones

Así los compuestos **3.21b** y **3.34a** han permitido mejorar entre 20 y 30 veces la  $CE_{90}$  respecto a nuestro prototipo **3.8** (Figura 3.18).

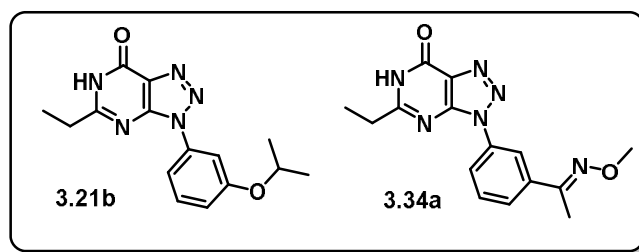


Figura 3.18

Además, estos compuestos no son citotóxicos y por lo tanto presentan un buen índice de selectividad. Esta baja citotoxicidad ha permitido la selección de cepas virales resistentes cuya secuenciación apunta a una proteína viral como posible diana molecular.

Por tanto, las 3-aril 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-onas constituyen una prometedora familia de compuestos de bajo peso molecular y fácilmente accesibles con potente actividad frente al virus reemergente CHIK cuyo mecanismo de acción está siendo objeto de estudio.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Métodos generales

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F<sub>254</sub> (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm y se visualizaron con luz ultravioleta (254 nm), mediante pulverización con disolución de ninhidrina en etanol al 2% o con disolución de ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. Este seguimiento también se ha llevado a cabo por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al agua se realizaron bajo estrictas condiciones anhidras. El THF se secó refluéndolo sobre CaH<sub>2</sub> o con tamiz molecular 4 Å activado previamente en la estufa. La *N,N*-dimetilformamida anhidra se obtuvo de fuentes comerciales (Aldrich).

Los experimentos de irradiación de microondas han sido realizados en un reactor de microondas monomodo Emrys<sup>TM</sup> Synthesizer (Biotage AB).

La purificación de los productos de reacción se ha realizado por: a) cromatografía centrífuga circular en capa fina (CCTLC) en Cromatotrón<sup>®</sup> (gel de sílice 60 PF<sub>254</sub> con CaSO<sub>4</sub>) en placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min respectivamente; b) cromatografía en cartucho SPE de gel de sílice y cromatografía flash (HPFC) en el Biotage Horizon; c) por HPLC semipreparativo mediante un cromatógrafo HPLC Waters 2545 conectado a un espectrómetro Waters 3100 Massdeterctor, empleando una columna Sunfire C-18 (150 mm x 19 mm x 5 µm) con un flujo de 24 mL/min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron registrados en un espectrofotómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 Hz), Varian UNITY-400 (a 400 y 100 Hz) y Varian 500 (a 500 y 125 Hz), respectivamente. Los espectros monodimensionales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en condiciones estándar. Se ha indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; sept, septete; dd,

doble doblete; ddd, doble doble doblete; pt, pseudo-triplete; dt, doble triplete; m, multiplete), el valor de las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz) y la asignación estructural. Los espectros bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) utilizan la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono (30000 Hz), con un tiempo de espera de 1 s. Para el experimento de HSQC se procesan los datos en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

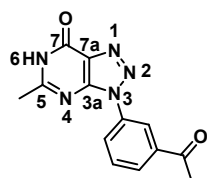
Los espectros de masas se han registrado en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100, mediante las técnicas de Impacto Electrónico o Electro spray.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo M170 de los productos precipitados.

Los análisis elementales de los compuestos se hallan en el rango de  $\pm 0.5$  respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado con un analizador Heareus CHN-O-RAPID.

El análisis de la muestra **TP274** se llevó a cabo por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ, empleando una columna Sunfire C-18 (150 mm x 19 mm x 5  $\mu$ m) con un flujo de 1 mL/min. Detector: Photodiode Array detector (PDA). Fase móvil: A ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y B ( $\text{H}_2\text{O}$  con 0.04% de ácido fórmico). Flujo: 1mL/min. Método: gradiente lineal A:B 10:90 a 100:0 en 10 minutos.

### 3-(3'-Acetilfenil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona (**3.8**)



Sobre una disolución que contiene la 7-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidina<sup>42</sup> (**3.7**) (80 mg, 0.29 mmol) en DMF (1.3 mL) se añade acetato sódico (70 mg, 0.88 mmol). La reacción se calienta al microondas a 120 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluye

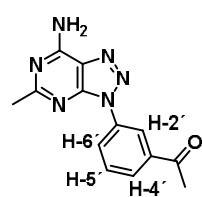
en diclorometano y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 30:1). Se obtienen 65 mg (83%) de **3.8** como un sólido amarillo.

**Pf** 257-259 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  270 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300

MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.67 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 7.83-8.56 (m, 4H, Ar), 12.79 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 27.4 (COCH<sub>3</sub>), 121.7, 126.9, 129.2 (Ar), 129.3 (C-7a), 136.1, 138.4, 130.8 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.2 (C-5), 161.3 (C-7), 197.5 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 57.99; H, 4.12; N, 26.01. Encontrado: C, 57.67; H, 3.98; N, 25.75.

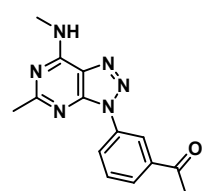
## 6.2. Síntesis de compuestos con modificaciones en la base heterocíclica

### 3-(3'-Acetilfenil)-7-amino-5-metil-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.9a)



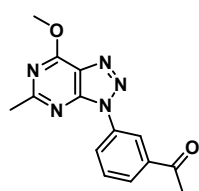
Una disolución de **3.7**<sup>42</sup> (100 mg, 0.34 mmol) en NH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 2.0 M (4 mL) se calienta por irradiación al microondas a 70 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se filtra y el precipitado se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 60 mg (66%) de **3.9a** como un sólido. **Pf** 286-287 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 269 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.69 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 7.82 (pt, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 8.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-6'), 8.17 (s, 1H, NH), 8.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4'), 8.50 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 1H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  26.7 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (COCH<sub>3</sub>), 120.9, 123.8, 126.1 (Ar), 128.6 (C-7a), 130.9, 137.1, 138.6 (Ar), 150.3 (C-3a), 156.7 (C-7), 168.0 (C-5), 197.9 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O. Calculado: C, 58.20; H, 4.51; N, 31.33. Encontrado: C, 57.96; H, 4.68; N, 31.09.

### 3-(3'-Acetilfenil)-5-metil-7-metilamino-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.9b)



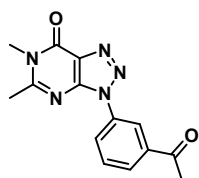
Una disolución de **3.7**<sup>42</sup> (100 mg, 0.34 mmol) en CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 2.0 M (10 mL) se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentra a sequedad y el crudo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 64 mg (67%) de **3.9b** como un sólido. **Pf** 220-221 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 283 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.68 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.05 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 7.82 (pt, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 8.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 8.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4'), 8.70 (s, 1H, H-2'), 8.92 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  27.2 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (COCH<sub>3</sub>), 27.8 (NHCH<sub>3</sub>), 120.9, 124.4, 126.1 (Ar), 128.6 (C-7a), 130.9, 137.1, 138.6 (Ar), 150.3 (C-3a), 156.7 (C-7), 168.0 (C-5), 197.9 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O. Calculado: C, 59.56; H, 5.00; N, 29.77. Encontrado: C, 59.46; H, 4.85; N, 29.58.

### 3-(3'-Acetilfenil)-7-metoxi-5-metil-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.10)



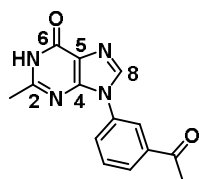
A una disolución de **3.7**<sup>42</sup> (100 mg, 0.32 mmol) en metanol (4 mL) se añade metóxido sódico (86 mg, 1.59 mmol). La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 20 min. La mezcla se concentra a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 30:1). Se obtienen 55 mg (61%) de **3.10** como un sólido blanco. **Pf** 158-160 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 284 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ 2.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.23 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.86-8.67 (m, 4H, Ar). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 26.8 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>3</sub>), 55.6 (OCH<sub>3</sub>), 125.2, 121.4, 126.6 (Ar), 129.3 (C-7a), 131.1, 136.5, 138.7 (Ar), 151.6 (C-3a), 161.6 (C-7), 168.0 (C-5), 197.8 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 59.36; H, 4.63; N, 24.72. Encontrado: C, 59.60; H, 4.62; N, 24.53.

### 3-(3'-Acetilfenil)-5,6-dimetil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.11)



A una disolución de **3.8** (90 mg, 0.33 mmol) en DMF (2 mL) se añade DBU (66 µL, 0.44 mmol) y yodometano (27 µL, 0.43 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche. Después, se añade una mezcla de hexano/éter (1:1) (10 mL). La suspensión resultante se enfría a -20 °C y se filtra. El precipitado se disuelve en diclorometano (20 mL) y se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (15 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 80 mg (86%) de **3.11** como un sólido amarillo. **Pf** 166-168 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 284 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.68 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.57 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 7.80-8.57 (m, 4H, Ar). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 24.2 (CH<sub>3</sub>), 26.9 (COCH<sub>3</sub>), 30.8 (NCH<sub>3</sub>), 121.0, 126.1, 128.1 (Ar), 128.6 (C-7a), 130.4, 135.6, 138.0 (Ar), 146.8 (C-3a), 155.5 (C-5), 162.1 (C-7), 197.1 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 59.36; H, 4.63; N, 24.72. Encontrado: C, 59.65; H, 4.59; N, 24.68.

### 9-(3'-Acetilfenil)-2-metil-1H-purin-6(9H)-ona (3.13a)

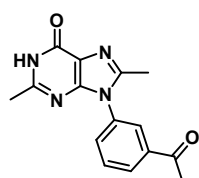


Una disolución de **3.12a**<sup>40</sup> (200 mg, 0.70 mmol) en metanol (12.6 mL) se trata con metóxido sódico (3.9 mmol) y 2-mercaptoetanol (146 µL, 2.09). La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 90 min. El producto se aísla por filtración obteniéndose 143 mg (76%) de **3.13a** como un sólido amarillo. **Pf** 286-287 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 269 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.64 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 7.68 (pt, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 7.93 (ddd, *J* = 7.8, 2.1, 1.1 Hz, 1H, H-6'), 8.15 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.0 Hz,



1H, H-4'), 8.25 (s, 1H, H-8), 8.43 (s, 1H, H-2'). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 25.6 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (COCH<sub>3</sub>), 122.7 (Ar), 123.3 (C-5), 126.8, 127.7, 130.5 (Ar), 136.5 (C-8), 137.1, 138.5 (Ar), 150.5 (C-4), 161.4 (C-2), 165.6 (C-6), 198.2 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 62.68; H, 4.51; N, 20.88. Encontrado: C, 62.52; H, 4.85; N, 20.79.

### 9-(3'-Acetilfenil)-2,8-dimetil-1*H*-purin-6(9*H*)-ona (3.13b)



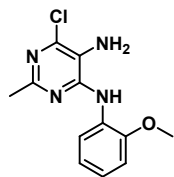
Una disolución de **3.12b**<sup>40</sup> (63 mg, 0.20 mmol) en dioxano (5.0 mL) se trata con HCl 1N. La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 2 h. La mezcla se extrae con acetato de etilo (15 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 mL) y salmuera (10 mL); se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo resultante se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 35 mg (61%) de **3.13b** como un sólido. **Pf** 282-283 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 283 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 7.74 (m, 2H, H-5', H-6'), 8.01 (dd, *J* = 2.4, 1.1 Hz, 1H, H-2'), 8.10 (ddd, *J* = 5.0, 3.5, 1.7 Hz, 1H, H-4'). **Análisis elemental** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 63.82; H, 5.00; N, 19.85. Encontrado: C, 63.58; H, 5.06; N, 19.98.

### 6.3. Síntesis de [1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona con modificaciones en el anillo aromático,

#### Procedimiento general para la reacción de 4,6-dicloropirimidinas con anilinas (3.16a-m).

En un vial de microondas se introduce la anilina correspondiente (**3.14**, 1.0 mmol), la 4,6-dicloropirimidina (**3.15**, 1.0 mmol), HCl acuoso al 37% (0.07 mL/mmol) e isobutanol (2.5 mL). Se sella el vial y se calienta en el microondas a 150 °C durante 10-30 min. La mezcla de reacción se deja enfriar y el sólido formado se aísla por filtración.

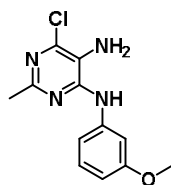
#### 6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(2'-metoxifenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (3.16a)



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (200 mg, 1.12 mmol) con 2-metoxianilina (126 μL, 1.12 mmol) en presencia de HCl al 37% (84 μL) en isobutanol (2.8 mL). La reacción se filtra obteniéndose 291 mg (98%) de **3.16a** como un sólido beige. **Pf** 241-243 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 265 (M+H)<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz): δ 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),

6.58 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.96 (m, H-6'), 7.14 (m, 2H, H-4', H-5'), 7.75 (m, 1H, H-3'), 8.68 (s, 1H, NH).

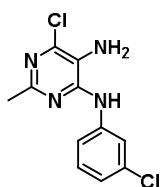
### 6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(3'-metoxifenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (**3.16b**)



Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (200 mg, 1.12 mmol) con 3-metoxianilina (126  $\mu$ L, 1.12 mmol) en presencia de HCl al 37% (84  $\mu$ L) en isobutanol (2.8 mL). La reacción se filtra obteniéndose 280 mg (95%) de **3.16b** como un sólido beige. **Pf** > 250 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  265

( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.49 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.62 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.2, 0.8 Hz, 1H, H-4'), 7.21 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.32 (ddd,  $J$  = 8.1, 2.1, 0.8 Hz, 1H, H-6'), 7.53 (pt,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, H-2'), 9.13 (s, 1H, NH).

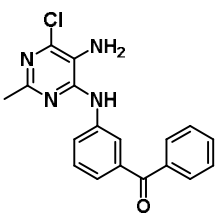
### 6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(3'-clorofenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (**3.16c**)



Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (100 mg, 0.48 mmol) con 3-cloroanilina (50  $\mu$ L, 0.48 mmol), en presencia de HCl al 37% (36  $\mu$ L) en isobutanol (1,2 mL).

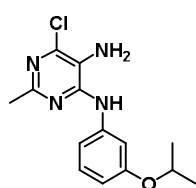
La reacción se filtra obteniéndose 120 mg (93%) de **3.16c** como un sólido marrón. **Pf** 239-241 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  269 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de 2 Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.05 (ddd,  $J$  = 8.0, 2.0, 0.8 Hz, 1H, H-4'), 7.33 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.73 (ddd,  $J$  = 8.3, 2.0, 0.8 Hz, 1H, H-6'), 7.99 (pt,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, H-2'), 9.11 (s, 1H, NH).

### 6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(3'-benzoilfenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (**3.16d**)



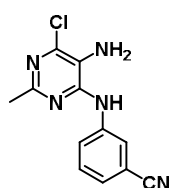
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (200 mg, 1.12 mmol) con 3-aminobenzofenona (221 mg, 1.12 mmol) en presencia de HCl al 37% (84  $\mu$ L) en isobutanol (2.8 mL). La reacción se filtra obteniéndose 338 mg (89%) de **3.16d** como un sólido oscuro que se utiliza tal cual para

el siguiente paso. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  339 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.23 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.56 (m, 5H, H-4', H-5', H-3'', H-4''), 7.78 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 8.06 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-6'), 8.26 (s, 1H, H-2'), 9.13 (s, 1H, NH).

**6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(3'-isopropoxifenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (3.16e)**

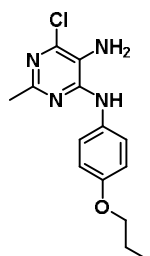
Seguendo el procedimiento general para la síntesis de 4,5-diaminopirimidinas, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (356 mg, 2.00 mmol) con 3-isopropoxianilina (300  $\mu$ L, 2.00 mmol) en presencia de HCl al 37% (150  $\mu$ L) en isobutanol (5.0 mL). La reacción se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol, 30:1) para obtener 417 mg (71%) de **3.16e**. **Pf** 144-146 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  293 (M+H)<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  1.28 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.53 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 5.18 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.54 (m, 1H, H-4'), 7.17 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.50 (pt,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, H-2'), 8.44 (s, 1H, NH).

Los compuestos **3.16f** y **3.16g** se prepararon siguiendo el procedimiento descrito.<sup>58</sup>

**3'-((5-Amino-6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino)benzonitrilo (3.16h)**

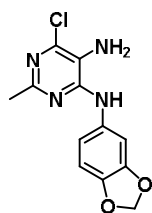
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (200 mg, 1.12 mmol) con 3-aminobenzonitrilo (133 mg, 1.12 mmol) en presencia de HCl al 37% (84  $\mu$ L) en isobutanol (2.8 mL). La reacción se filtra obteniéndose 264 mg (91%) de **3.16h** como un sólido marrón. **Pf** 235-237 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  260 (M+H)<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.75 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.50 (m, 2H, H-4', H-5'), 8.08 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1H, H-6'), 8.30 (s, 1H, H-2'), 9.28 (s, 1H, NH).

Los compuestos **3.16i** y **3.16j** se prepararon siguiendo el procedimiento descrito.<sup>40</sup>

**6-Cloro-2-metil-*N*<sup>4</sup>-(4'-propoxifenil)pirimidin-4,5-diamina (3.16k)**

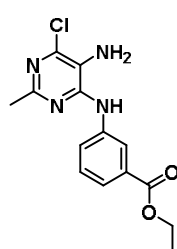
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (356 mg, 2.00 mmol) con 4-propoxianilina (297  $\mu$ L, 2.00 mmol) en presencia de HCl al 37% (150  $\mu$ L) en isobutanol (5.0 mL). La reacción se filtra obteniéndose 493 mg (84%) de **3.16k** como un sólido beige. **Pf** 208-209 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  293 (M+H)<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  0.96 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.71 (hex,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.90 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.91 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 2H, H-3'), 7.59 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-2'), 9.14 (s, 1H, NH).

### 6-Cloro-*N*<sup>4</sup>-(3',4'-metilendioxiifenil)-2-metilpirimidin-4,5-diamina (**3.16l**)



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (200 mg, 1.12 mmol) con 3,4-(metilendioxi)anilina (154 mg, 1.12 mmol) en presencia de HCl al 37% (84  $\mu$ L) en isobutanol (2.8 mL). La reacción se filtra obteniéndose 278 mg (89%) de **3.16l** como un sólido negro. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  279 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.47 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.88 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.11 (dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, 1H, H-6'), 7.43 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, H-2'), 9.38 (s, 1H, NH).

### 3'-((5-Amino-6-cloro-2-metilpirimidin-4-il)amino)benzoato de etilo (**3.16m**)

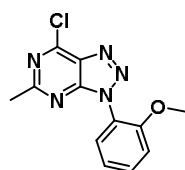


Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar 5-amino-4,6-dicloro-2-metilpirimidina (300 mg, 1.69 mmol) con 3-aminobenzoato de etilo (247  $\mu$ L, 1.69 mmol) en presencia de HCl al 37% (127  $\mu$ L) en dioxano (4.2 mL). La reacción se filtra obteniéndose 511 mg (98%) de **3.16m** como un sólido beige. **Pf** 237-239 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  307 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  1.33 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.31 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.84 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.46 (pt,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 7.60 (m, 1H, H-4'), 8.12 (ddd,  $J$  = 8.0, 2.3, 1.1 Hz, 1H, H-6'), 8.46 (pt,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H-2'), 9.05 (s, 1H, NH).

### Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidinas (**3.17a-m**) a partir de 4,5-diaminopirimidinas (**3.16a-m**).

A una suspensión de la correspondiente 4,5-diaminopirimidina (**3.16**, 1.00 mmol) en diclorometano (3.5 mL/mmol) se añade NaNO<sub>2</sub> (1.05 mmol) y HCl ac 1N (3.5 mL/mmol). La reacción se agita durante 30 min a temperatura ambiente. Se extrae con diclorometano. La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a sequedad.

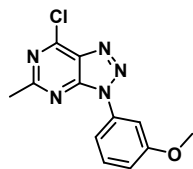
### 7-Cloro-3-(2'-metoxifenil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidina (**3.17a**)



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16a** (296 mg, 1.12 mmol) con NaNO<sub>2</sub> (81 mg, 1.17 mmol) en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:HCl 1N (1:1) (7.8 mL). Después del procesado se obtienen 233 mg (75%) de **3.17a** como un sólido marrón. **Pf** 156-158 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  276 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz):  $\delta$  2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.15 (ddd,  $J$  = 7.6, 1.7, 1.1 Hz, 1H, H-5'), 7.32 (dd,  $J$  =

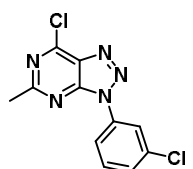
8.5, 1.1 Hz, 1H, H-3'), 7.47 (dd,  $J = 7.8, 1.7$  Hz, 1H, H-6'), 7.62 (ddd,  $J = 8.4, 7.5, 1.7$  Hz, 1H, H-4').

#### 7-Cloro-3-(3'-metoxifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17b)



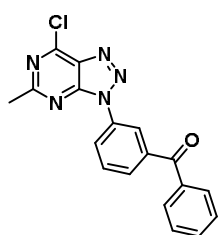
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16b** (296 mg, 1.12 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (81 mg, 1.17 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (7.8 mL). Después del procesado se obtienen 233 mg (75%) de **3.17b** como un sólido. **Pf** > 110 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  276 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.80 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.17 (ddd,  $J = 8.3, 2.4, 1.1$  Hz, 1H, H-4'), 7.52-7.70 (m, 3H, H-2', H-5', H-6').

#### 7-Cloro-3-(3'-clorofenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17c)



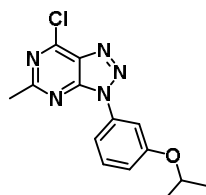
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16c** (300 mg, 1.11 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (81 mg, 1.17 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (7.8 mL). Después del procesado se obtienen 203 mg (65%) de **3.17c** como un sólido marrón claro. **Pf** 106-108 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  280 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.62 (ddd,  $J = 8.0, 2.0, 1.0$  Hz, 1H, H-4'), 7.68 (pt,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H-5'), 8.02 (ddd,  $J = 8.1, 2.0, 1.0$  Hz, 1H, H-6'), 8.13 (pt,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-2').

#### 7-Cloro-3-(3'-benzoilfenil)-5-metil-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17d)



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16d** (338 mg, 1.00 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (73 mg, 1.05 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (7.0 mL). Después del procesado se obtienen 195 mg (56%) de **3.17d** como un sólido marrón claro. **Pf** 136-138 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  350 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.78 (m, 7H, H-4', H-5', H-2'', H-3'', H-4''), 8.43 (m, 1H, H-6'), 8.50 (pt,  $J = 1.6$  Hz, 1H, H-2').

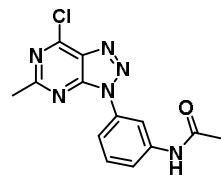
#### 7-Cloro-3-(3'-isopropoxifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17e)



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16e** (150 mg, 0.51 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (69 mg, 0.56 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (4.0 mL). Después del procesado, el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 1:1). Se obtienen 152 mg (61%) de **3.17e** como un sólido. **Pf** 223-225 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  304 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300

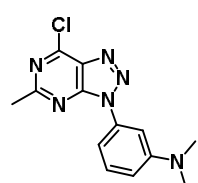
MHz):  $\delta$  1.34 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.74 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.16 (m, 1H, H-4'), 7.62 (m, 3H, H-2', H-5', H-6').

***N*-(3'-(7-Cloro-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-3-il)fenil)acetamida (3.17f)**



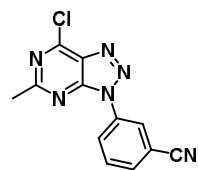
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16f** (150 mg, 0.51 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (35 mg, 0.51 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COOH}$  (1:1) (8.0 mL). Después del procesado, el crudo de reacción se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 108 mg (70%) de **3.17f** como un sólido beige. **Pf** 296-298 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  303 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.09 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.53-8.36 (m, 4H, Ar), 12.75 (s, 1H, NH).

**3'-(7-Cloro-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-3-il)-*N,N*'-dimetilanilina (3.17g)**



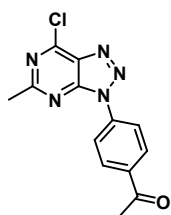
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16g** (312 mg, 1.12 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (81 mg, 1.18 mmol) en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (8.0 mL). Después del procesado se obtienen 87 mg (27%) de **3.17g** como un sólido amarillo. **Pf** 140-141 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  289 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.95 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 8.09 (m, 1H, H-4'), 8.48 (ddd,  $J$  = 8.2 Hz, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H-6'), 8.59 (pt,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H-2').

**3'-(7-Cloro-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-3-il)benzonitrilo (3.17h)**

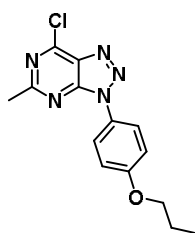


Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16h** (264 mg, 1.02 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (74 mg, 1.05 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (7.2 mL). Después del procesado se obtienen 202 mg (73%) de **3.17h** como un sólido marrón. **Pf** 136-138 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  271 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.95 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 8.09 (m, 1H, H-6'), 8.48 (ddd,  $J$  = 8.2, 2.2, 1.1 Hz, 1H, H-4'), 8.59 (pt,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H-2').

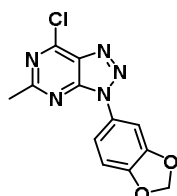
El compuesto **3.17i** se preparó siguiendo el procedimiento descrito.<sup>42</sup>

**7-Cloro-3-(4'-acetilfenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17j)**

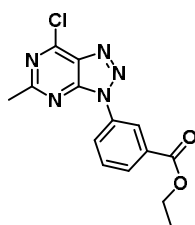
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16j** (240 mg, 0.86 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (66 mg, 0.95 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (4.0 mL). Después del procesado se obtienen 152 mg (61%) de **3.17j** como un sólido. **Pf** 195-197 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  288  $(\text{M}+\text{H})^+$  con distribución isotópica de Cl.  **$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.65 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 8.19-8.35 (m, 4H, Ar).

**7-Cloro-3-(4'-propoxifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17k)**

Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16k** (150 mg, 0.51 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (40 mg, 0.46 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (4.0 mL). Después del procesado se obtienen 116 mg (75%) de **3.17k** como un sólido. **Pf** 222-224 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  304  $(\text{M}+\text{H})^+$  con distribución isotópica de Cl.  **$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  1.00 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.77 (h,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.78 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.03 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 7.22 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-3'), 7.92 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H, H-2').

**7-Cloro-3-(3',4'-metilendioxfifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidina (3.17l)**

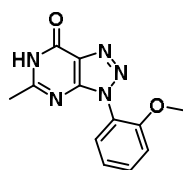
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16l** (221 mg, 0.79 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (57 mg, 0.83 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (5.6 mL). Después del procesado se obtienen 60 mg (26%) de **3.17l** como un sólido beige. **Pf** > 300 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  290  $(\text{M}+\text{H})^+$  con distribución isotópica de Cl.  **$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 6.17 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.17 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-5'), 7.42 (dd,  $J = 8.3, 2.0$  Hz, 1H, H-6'), 7.49 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-2').

**3'-(7-Cloro-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)benzoato de etilo (3.17m)**

Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.16m** (511 mg, 1.67 mmol) con  $\text{NaNO}_2$  (121 mg, 1.75 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{HCl}$  1N (1:1) (11.6 mL). Después del procesado se obtienen 367 mg (69%) de **3.17m** como un sólido blanco. **Pf** 109-110 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  318  $(\text{M}+\text{H})^+$  con distribución isotópica de Cl.  **$^1\text{H}$  RMN** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  1.36 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.82 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.39 (c,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.87 (pt,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-5'), 8.15 (m, 1H, H-6'), 8.42 (m, 1H, H-4'), 8.70 (pt,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H-2').

**Procedimiento general para la síntesis de [1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-onas (3.18a-m) a partir de 7-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidinas (3.17a-m).** Sobre una disolución que contiene la correspondiente 7-cloro-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidina (3.17) (1.00 mmol) en DMF (4.5 mL/mmol) se añade acetato sódico (3.00 mmol). La reacción se calienta al microondas a 120 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluye en diclorometano y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El crudo resultante se purifica como se indica en cada caso.

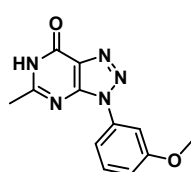
**3-(2'-Metoxifenil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona (3.18a)**



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17a** (170 mg, 0.62 mmol) con acetato sódico (154 mg, 1.85 mmol) en DMF (2.8 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por precipitación con diclorometano/hexano. Se obtienen 79 mg (50%) de **3.18a** como un sólido beige. **Pf** 235-237 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 258 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.16 (m, 1H, H-5'), 7.33 (d, *J* = 8.5, 1H, H-3'), 7.48 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H, H-4'), 7.63 (m, 1H, H-6'), 12.63 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 21.8 (CH<sub>3</sub>), 56.5 (OCH<sub>3</sub>), 113.5, 121.1, 123.3, 127.9 (Ar), 129.2 (C-7a), 132.7 (Ar), 150.8 (C-3a), 154.9 (Ar), 156.3 (C-5), 160.7 (C-7).

**Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 56.03; H, 4.31; N, 27.22. Encontrado: C, 55.92; H, 3.97; N, 26.90.

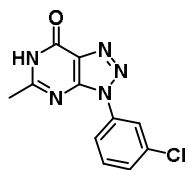
**3-(3'-Metoxifenil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona (3.18b)**



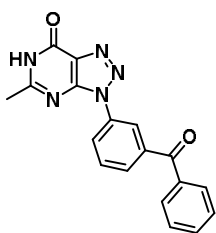
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17b** (167 mg, 0.61 mmol) con acetato sódico (151 mg, 1.82 mmol) en DMF (2.7 mL). Después del lavado, el crudo resultante se lava con diclorometano obteniéndose 84 mg (54%) de **3.18b** como un sólido beige. **Pf** 280-282 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 258 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.10 (ddd, *J* = 8.3, 2.3, 1.2 Hz, 1H, H-4'), 7.54 (pt, *J* = 8.3, 1H, H-5'), 7.61 (m, 2H, H-2', H-6'), 12.74 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 22.4 (CH<sub>3</sub>), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 108.3, 114.5, 114.7 (Ar), 129.3 (C-7a), 131.0, 136.8 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.9 (C-5), 160.3 (C-7), 161.5 (Ar).

**Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 56.03; H, 4.31; N, 27.22. Encontrado: C, 55.96; H, 4.10; N, 27.12.

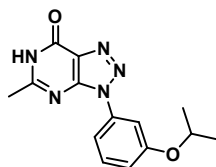


**3-(3'-Clorofenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18c)**

Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17c** (150 mg, 0.54 mmol) con acetato sódico (133 mg, 1.61 mmol) en DMF (2.4 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por precipitación con diclorometano/ hexano. Se obtienen 109 mg (77%) de **3.18c** como un sólido beige. **Pf** 255-257 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  262 ( $M+H$ )<sup>+</sup> con distribución isotópica de Cl. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.62 (ddd,  $J$  = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 1H, H-4'), 7.68 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 8.03 (ddd,  $J$  = 8.0, 2.0, 1.1 Hz, 1H, H-6'), 8.13 (pt,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, H-2'), 12.79 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 121.1, 122.1, 129.2 (Ar), 129.3 (C-7a), 131.9, 134.3, 136.9 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.1 (C-5), 161.4 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 50.49; H, 3.08; N, 26.76. Encontrado: C, 50.79; H, 2.91; N, 26.58.

**3-(3'-Benzoilfenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18d)**

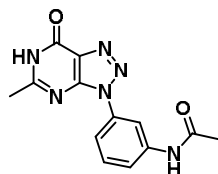
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17d** (195 mg, 0.56 mmol) con acetato sódico (139 mg, 1.67 mmol) en DMF (2.5 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por precipitación con diclorometano/hexano. Se obtienen 140 mg (75%) de **3.18d** como un sólido amarillo. **Pf** 281-283 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  332 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.74 (m, 7H, H-4', H-5', H-2'', H-3'', H-4''), 8.31 (ddd,  $J$  = 7.8, 2.1, 1.3 Hz, 1H, H-6'), 8.39 (pt,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, H-2'), 12.76 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.3 (CH<sub>3</sub>), 123.5, 129.4 (Ar), 129.6 (C-7a), 126.4, 130.4, 130.5, 131.0, 133.8, 136.0, 137.1, 138.7 (Ar), 149.5 (C-3a), 156.4 (C-5), 161.5 (C-7), 195.2 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 65.25; H, 3.95; N, 21.14. Encontrado: C, 64.98; H, 3.81; N, 20.89.

**3-(3'-Isopoxifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18e)**

Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17e** (60 mg, 0.19 mmol) con acetato sódico (75 mg, 0.57 mmol) en DMF (1.0 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 38 mg (71%) de **3.18e** como un sólido. **Pf** 224-225 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  286 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1.33 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.71 (sept,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, CH), 7.10 (m, 1H, H-4'), 7.54 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 12.75 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>), 70.2 (CH), 109.5, 114.1, 116.0 (Ar), 129.3 (C-7a), 131.0, 137.0 (Ar), 157.5 (C-5), 158.4 (Ar), 161.8

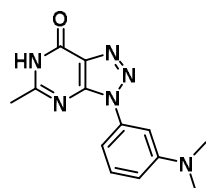
(C-7). **Análisis elemental** (%) para  $C_{14}H_{15}N_5O_2$ . Calculado: C, 58.94; H, 5.30; N, 24.55. Encontrado: C, 58.75; H, 5.60; N, 24.25.

**N-(3-(5-Metil-7-oxo-6,7-dihidro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)fenil)-acetamida (3.18f)**



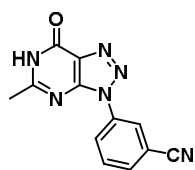
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17f** (90 mg, 0.30 mmol) con acetato sódico (75 mg, 0.90 mmol) en DMF (1.5 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 30:1). Se obtienen 30 mg (35%) de **3.18f** como un sólido blanco. **Pf** 287-289 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  285 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO- $d_6$ , 300 MHz):  $\delta$  2.09 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.53-8.35 (m, 4H, Ar), 10.29 (s, 1H, NH), 12.74 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 24.5 (COCH<sub>3</sub>), 112.9, 117.0, 119.5 (Ar), 129.3 (C-7a), 130.4, 135.9, 140.8 (Ar), 149.1 (C-3a), 156.2 (C-5), 161.0 (C-7), 169.2 (CO). **Análisis elemental** (%) para  $C_{13}H_{12}N_6O_2$ . Calculado: C, 54.93; H, 4.25; N, 29.56. Encontrado: C, 54.82; H, 4.36; N, 29.65.

**3-(3'-(Dimetilamino)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18g)**



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17g** (50 mg, 0.17 mmol) con acetato sódico (43 mg, 0.52 mmol) en DMF (0.8 mL). El precipitado resultante se filtra y se lava con agua obteniéndose 38 mg (81%) de **3.18g** como un sólido amarillo. **Pf** 319-321 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  272 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.97 (s, 3H, NMe<sub>2</sub>), 6.86 (dd,  $J$  = 8.4, 2.2 Hz, 1H, H-6'), 7.21 (dd,  $J$  = 8.0, 1.2 Hz, 1H, H-4'), 7.27 (pt,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, H-2'), 7.40 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 12.68 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 40.4 (NMe<sub>2</sub>), 106.2 (C-2'), 110.0 (C-4'), 113.0 (C-6'), 129.2 (C-7a), 130.3 (C-5'), 136.6 (C-1'), 149.1 (C-3a), 151.4 (C-3'), 156.3 (C-5), 160.8 (C-7). **Análisis elemental** (%) para  $C_{13}H_{14}N_6O$ . Calculado: C, 57.77; H, 5.22; N, 31.09. Encontrado: C, 57.51; H, 5.02; N, 30.78.

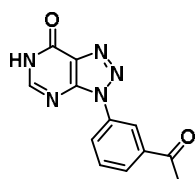
**3'-(5-Metil-7-oxo-6,7-dihidro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)benzonitrilo (3.18h)**



Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17h** (170 mg, 0.63 mmol) con acetato sódico (153 mg, 1.88 mmol) en DMF (2.8 mL). Después del lavado, el crudo resultante se lava con éter y el sólido obtenido se purifica por precipitación con diclorometano/metanol. Se obtienen 104 mg (65%) de **3.18h** como un sólido beige. **Pf** > 280 °C (descomp). **EM** (ES,

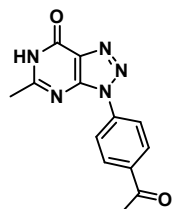
modo positivo):  $m/z$  253 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.87 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 8.03 (m, 1H, H-6'), 8.39 (ddd,  $J$  = 8.3, 2.1, 1.0 Hz, 1H, H-4'), 8.50 (pt,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H-2'), 12.82 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.0 (CH<sub>3</sub>), 112.9 (Ar), 118.3 (CN), 125.7, 127.3 (Ar), 129.2 (C-7a), 131.7, 133.1, 136.1 (Ar), 149.4 (C-3a), 156.3 (C-5), 161.4 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O. Calculado: C, 57.14; H, 3.20; N, 33.32. Encontrado: C, 57.02; H, 3.25; N, 33.45.

### 3-(3'-Acetilfenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.18i)



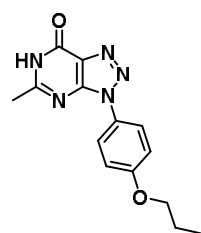
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17i** (90 mg, 0.33 mmol) con acetato sódico (82 mg, 0.99 mmol) en DMF (1.5 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 50 mg (59%) de **3.18i** como un sólido beige. **Pf** 262-264 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  256 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.80 (pt,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 8.13 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 8.28 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-4'), 8.37 (s, 1H, H-5), 8.55 (s, 1H, H-2'), 12.94 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  27.6 (CH<sub>3</sub>), 121.7, 127.0 (Ar), 129.6 (C-7a), 131.0, 131.2, 136.2, 138.6 (Ar), 149.1 (C-3a), 151.4 (C-7), 155.9 (C-5), 197.7 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 56.47; H, 3.55; N, 27.44. Encontrado: C, 56.28; H, 3.69; N, 27.25.

### 3-(4'-Acetilfenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.18j)



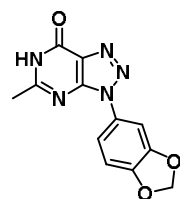
Siguiendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17j** (86 mg, 0.29 mmol) con acetato sódico (75 mg, 0.87 mmol) en DMF (2.0 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 54 mg (62%) de **3.18j** como un sólido. **Pf** 286-287 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  270 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.64 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 8.24 (m, 4H, H-2', H-3'), 12.75 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (CH<sub>3</sub>), 122.0 (Ar), 129.5 (C-7a), 130.2, 136.8, 139.1 (Ar), 149.4 (C-3a), 156.1 (C-5), 161.4 (C-7), 197.5 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 57.99; H, 4.12; N, 26.01. Encontrado: C, 57.84; H, 4.28; N, 25.95.

### 5-Metil-3-(4'-propoxifenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18k)



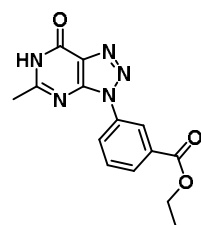
Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17k** (60 mg, 0.19 mmol) con acetato sódico (50 mg, 0.57 mmol) en DMF (2.0 mL). Después del lavado, el crudo resultante se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 35 mg (65%) de **3.18k** como un sólido. **Pf** 267-268 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  286 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1.01 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.78 (hex,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.03 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 7.18 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-3'), 7.85 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H, H-2'), 12.69 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  11.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 70.1 (OCH<sub>2</sub>), 115.8, 124.8, 128.7 (Ar), 129.2 (C-7a), 149.2 (C-3a), 156.5 (C-5), 159.6 (C-7), 160.9 (Ar). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 58.94; H, 5.30; N, 24.55. Encontrado: C, 58.84; H, 5.55; N, 24.36.

### 3-(3',4'-Metilendioxfifenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.18l)



Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17l** (32 mg, 0.11 mmol) con acetato sódico (28 mg, 0.33 mmol) en DMF (0.5 mL). La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se lava con agua. Se obtienen 15 mg (50%) de **3.18l** como un sólido beige. **Pf** > 290 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  272 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.10 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.57 (dd,  $J$  = 8.4, 2.0 Hz, 1H, H-6'), 7.63 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  24.0 (CH<sub>3</sub>), 102.3 (CH<sub>2</sub>), 103.3, 108.9, 115.3 (Ar), 129.3 (C-7a), 131.1, 147.0, 148.1 (Ar), 150.3 (C-3a), 165.1 (C-5), 173.9 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>. Calculado: C, 53.14; H, 3.34; N, 25.82. Encontrado: C, 53.02; H, 3.68; N, 25.77.

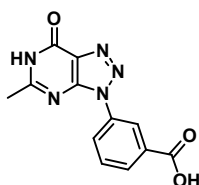
### 3'-(5-Metil-7-oxo-6,7-dihidro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)benzoato de etilo (3.18m)



Seguendo el procedimiento general, se hace reaccionar **3.17m** (46 mg, 0.14 mmol) con acetato sódico (36 mg, 0.43 mmol) en DMF (0.7 mL). Después del lavado, el crudo resultante se disuelve en diclorometano y se precipita con hexano obteniéndose 24 mg (57%) de **3.18m** como un sólido beige. **Pf** 245-247 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  300 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  1.34 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.37 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.81 (pt,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 8.09 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-6'), 8.33 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 8.62 (t, 1H, H-2'), 12.78 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  14.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.1 (CH<sub>3</sub>), 61.8 (CH<sub>2</sub>), 122.6, 126.7 (Ar), 129.4

(C-7a), 129.7, 130.8, 131.7, 136.1 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.2 (C-5), 161.3 (C-7), 165.2 (CO). **Análisis elemental** (%) para  $C_{14}H_{13}N_5O_3$ . Calculado: C, 56.18; H, 4.38; N, 23.40. Encontrado: C, 56.02; H, 4.62; N, 23.33.

**Ácido 3'-(5-metil-7-oxo-6,7-dihidro-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il)benzoico (3.18n)**

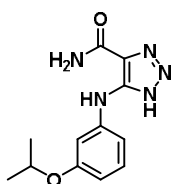


Sobre una disolución de **3.18m** (500 mg, 1.67 mmol) en DMF (11.0 mL/mmol) se le añade KOH al 20% (4.3 mL). La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 30 min. La mezcla se disuelve en agua y se acidifica con HCl 1N. El precipitado se aísla por filtración obteniéndose 419 mg (92%) de **3.18n** como un sólido amarillo. **Pf** > 290 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  272 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.79 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 8.08 (m, 1H, H-6'), 8.29 (ddd,  $J$  = 8.0, 2.2, 1.0 Hz, 1H, H-4'), 8.58 (pt,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, H-2'), 12.78 (s, 1H, NH), 13.42 (s, 1H, COOH). **<sup>13</sup>C RMN** (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  22.1 (CH<sub>3</sub>), 122.9, 126.5 (Ar), 129.4 (C-7a), 129.9, 130.7, 132.7, 136.0 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.2 (C-5), 161.3 (C-7), 166.8 (COOH). **Análisis elemental** (%) para  $C_{12}H_9N_5O_3$ . Calculado: C, 53.14; H, 3.34; N, 25.82. Encontrado: C, 52.95; H, 3.28; N, 25.75.

#### 6.4. Síntesis de compuestos modificados en la posición 5 del heterociclo

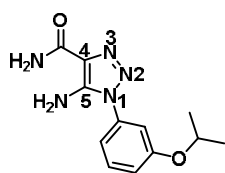
**5-Amino-1-(3'-isopropoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (3.20a) y 5-((3'-isopropoxifenil)amino)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (3.20b)**

A una disolución de Na (71 mg, 3.08 mmol) en etanol (3 mL) se añade cianoacetamida (130 mg, 1.54 mmol) durante 30 min. Después se le adiciona la azida **3.19**<sup>44</sup> (273 mg, 1.54 mmol) y la reacción se calienta a reflujo durante 2 h. La mezcla se concentra a sequedad. El bruto obtenido se disuelve en agua, se acidifica con ácido acético y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se lava con NaHCO<sub>3</sub> saturado y salmuera, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por cromatografía flash (hexano/acetato de etilo, 1:1). Se obtienen 274 mg (68%) de **3.20b** como un sólido amarillento y 60 mg (15%) de **3.20a** como un sólido amarillo.



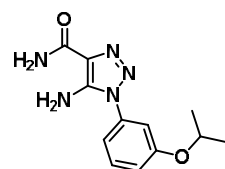
**3.20b** → **Pf** 212-213 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  262 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.25 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.56 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 6.42 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 6.96 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-6'), 7.13 (t,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.21 (s 1H, H-2'), 7.53 (s,

1H, NH-amida), 7.86 (s, 1H, NH-amida), 8.53 (s, 1H, NH-amina), 14.67 (s, 1H, NH-triazol). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 55.16; H, 5.79; N, 26.80. Encontrado: C, 54.68; H, 5.87; N, 26.61.



**3.20a** → Pf 123-125 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 262 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.29 (d, J = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.70 (sept, J = 5.7 Hz, 1H, CH), 6.37 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.08 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7.26 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 7.47 (pt, J = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 7.62 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 22.4 (CH<sub>3</sub>), 70.4 (CH), 111.6, 116.5, 116.9 (Ar), 122.3 (C-4), 131.3, 136.6 (Ar), 145.3 (C-5), 158.9 (Ar), 165.0 (CO). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 55.16; H, 5.79; N, 26.80. Encontrado: C, 55.30; H, 5.80; N, 26.78.

### 5-Amino-1-(3'-isoproxifenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (**3.20a**)

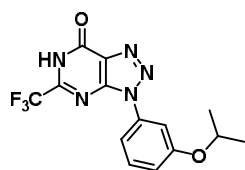


Sobre una suspensión de NaH (60% en aceite mineral, 152 mg, 6.24 mmol) en DMF anhidra (5.9 mL) se adiciona una disolución de cianoacetamida (326 mg, 3.88 mmol) en DMF anhidra (5.9 mL) y se agita a 0 °C 30 min. A continuación se añade lentamente a 0 °C una disolución de **3.19**<sup>44</sup> (624 mg, 3.52 mmol) en DMF anhidra (5.9 mL). La mezcla de reacción se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Se concentra y el crudo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 641 mg (70%) de **3.20a** como un sólido amarillo, cuyos datos analíticos y espectroscópicos se han aportado en el párrafo anterior.

### Procedimiento general para la síntesis de [1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-onas (**3.21**) a partir de 5-amino-1H-1,2,3-triazolo-4-carboxamidas.

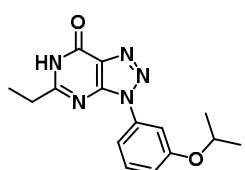
A una disolución de Na (5.00 mmol) en etanol (10 mL/mmol) se añade la carboxamida **3.20a** (1.00 mmol) y el ester correspondiente (4.00 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 1-8 h. La mezcla se concentra a sequedad. El crudo se disuelve en agua y se acidifica con ácido acético. El precipitado que se forma se filtra y el sólido se purifica como se indica en cada caso

**3-(3'-Isopropoxifenil)-5-trifluorometil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.21a)**



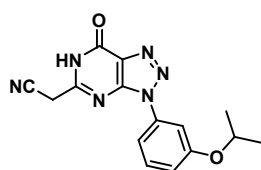
Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (43 mg, 1.85 mmol) en etanol (3.7 mL) se añade **3.20a** (96 mg, 0.37 mmol) y trifluoroacetato de etilo (175  $\mu$ L, 1.47 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 1 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra obteniéndose 84 mg (67%) de **3.21a** como un sólido blanco. **Pf** 214-216 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  340 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.32 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.69 (sept,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, CH), 7.13 (ddd,  $J$  = 7.8, 2.5, 1.6, 1H, H-4'), 7.55 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  22.0 (CH<sub>3</sub>), 70.4 (CH), 109.8, 114.5, 117.1 (Ar), 122.1 (q ap, CF<sub>3</sub>), 131.2 (C-7a), 131.3, 136.2 (Ar), 147.5 (C-3a), 148.0 (d,  $J$  = 39.3 Hz, C-5), 156.7 (C-7), 158.6 (Ar). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 49.56; H, 3.57; N, 20.64. Encontrado: C, 49.29; H, 3.33; N, 20.38.

**5-Etil-3-(3'-isopropoxifenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.21b)**



Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (44 mg, 1.90 mmol) en etanol (3.8 mL) se añade **3.20a** (100 mg, 0.38 mmol) y propionato de etilo (176  $\mu$ L, 1.52 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 8 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra y se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 60 mg (53%) de **3.21b** como un sólido blanco. **Pf** 242-244 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  300 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.23 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.71 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.69 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.06 (d,  $J$  = 8.0, 1H, H-4'), 7.51 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.58 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-6'), 7.63 (s, 1H, H-2'), 12.70 (s 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.5 (CH<sub>3</sub>), 22.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 70.3 (CH), 109.2, 114.0, 116.6 (Ar), 129.4 (C-7a), 131.1, 136.9 (Ar), 149.1 (C-3a), 156.3 (C-7), 158.5 (Ar), 165.0 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 60.19; H, 5.72; N, 23.40. Encontrado: C, 60.21; H, 6.01; N, 23.62.

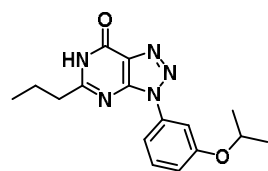
**5-Cianoetil-3-(3'-isopropoxifenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.21c)**



Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (38 mg, 1.65 mmol) en etanol (3.3 mL) se añade **3.20a** (90 mg, 0.33 mmol) y cianoacetato de etilo (140  $\mu$ L, 1.31 mmol). La reacción se

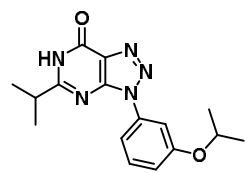
calienta a reflujo durante 8 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra y se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 23 mg (23%) de **3.21c** como un sólido beige. **Pf** 242-244 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  311 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.30 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.73 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.07 (ddd,  $J$  = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H-4'), 7.52 (pt,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.60 (ddd,  $J$  = 8.0, 1.9, 0.9 Hz, 1H, H-6'), 7.73 (pt,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, H-2'), 13.05 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  22.2 (CH<sub>3</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>), 70.4 (CH), 108.8, 113.8 (Ar), 115.6 (CN), 117.2 (Ar), 129.8 (C-7a), 131.2, 136.7 (Ar), 148.3 (C-3a), 154.8 (C-5), 155.7 (C-7), 158.6 (Ar). **Análisis elemental** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 58.06; H, 4.55; N, 27.08. Encontrado: C, 57.96; H, 4.52; N, 26.98.

### 3-(3'-Isopropoxifenil)-5-propil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (**3.21d**)



Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (36 mg, 1.55 mmol) en etanol (3.1 mL) se añade **3.20a** (80 mg, 0.31 mmol) y butirato de etilo (139  $\mu$ L, 1.22 mmol). La reacción se calienta al microondas a 90 °C durante 2 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra y se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 23 mg (24%) de **3.21d** como un sólido blanco. **Pf** 216-218 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  314 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  0.93 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.74 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66 (h,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.68 (sept,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, CH), 7.07 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-4'), 7.51 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.57 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-6'), 7.62 (s, 1H, H-2'), 12.70 (s 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  13.8 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 22.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 36.5 (CH<sub>2</sub>), 70.3 (CH), 109.3, 114.1, 116.6 (Ar), 129.4 (C-7a), 131.1, 136.9 (Ar), 149.1 (C-3a), 156.4 (C-7), 158.5 (Ar), 164.0 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 61.33; H, 6.11; N, 22.35. Encontrado: C, 61.08; H, 6.23; N, 22.46.

### 3-(3'-Isopropoxifenil)-5-isopropil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (**3.21e**)

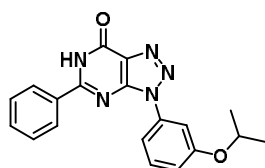


Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (36 mg, 1.55 mmol) en etanol (3.1 mL) se añade **3.20a** (80 mg, 0.31 mmol) e isobutirato de etilo (140  $\mu$ L, 1.22 mmol). La reacción se calienta al microondas a 90 °C durante 2 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra y se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 8 mg (8%) de **3.21e** como un sólido blanco. **Pf** 246-247 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  314 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.25 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 6H,



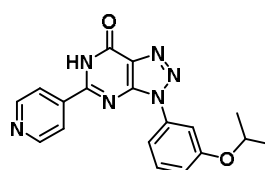
CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.00 (hept,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, CH), 4.69 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, OCH), 7.05 (ddd,  $J$  = 8.3, 2.5, 0.9 Hz, 1H, H-4'), 7.52 (pt,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.60 (ddd,  $J$  = 8.1, 2.0, 0.9 Hz, 1H, H-6'), 7.68 (pt,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, H-2'), 12.69 (s 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  21.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.4 (OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 33.9 (CH), 70.5 (OCH), 109.0, 114.1, 117.1 (Ar), 129.7 (C-7a), 131.4, 137.2 (Ar), 149.2 (C-3a), 156.7 (C-7), 158.7 (Ar), 168.5 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 61.33; H, 6.11; N, 22.35. Encontrado: C, 61.08; H, 6.23; N, 22.46.

### 3-(3'-Isopropoxifenil)-5-fenil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.21f)



Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (33 mg, 1.45 mmol) en etanol (2.9 mL) se añade **3.20a** (80 mg, 0.31 mmol) y fenilacetato de etilo (145  $\mu$ L, 1.16 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 8 h. Después del procesado, aparece un precipitado que se filtra y se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1). Se obtienen 44 mg (41%) de **3.21f** como un sólido beige. **Pf** 245-246 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  348 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.33 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.73 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.09 (m, 1H, H-4'), 7.62 (m, 6H, H-3'', H-4'', H-2', H-5', H-6'), 8.14 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, H-2''), 13.05 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  22.3 (CH<sub>3</sub>), 70.6 (CH), 109.5, 114.5, 117.2, 129.2, 129.5 (Ar), 129.8 (C-7a), 131.4, 132.3, 133.1, 137.1 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.9 (C-7), 158.4 (Ar), 158.8 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 65.69; H, 4.93; N, 20.16. Encontrado: C, 65.43; H, 5.08; N, 20.07.

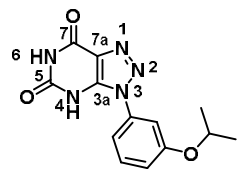
### 3-(3'-Isopropoxifenil)-5-(4''-piridil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.21g)



Siguiendo el procedimiento general, a una disolución de Na (33 mg, 1.45 mmol) en etanol (2.9 mL) se añade **3.20a** (80 mg, 0.31 mmol) y 4-piridilacetato de metilo (159  $\mu$ L, 1.16 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 5 h. Después del procesado, el precipitado se filtra obteniéndose 85 mg (79%) de **3.21g** como un sólido beige. **Pf** 259-260 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  349 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.33 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.73 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.11 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, H-4'), 7.56 (pt,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 7.66 (m, 2H, H-2', H-6'), 8.05 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, H-2''), 8.83 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, H-3''). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  22.2 (CH<sub>3</sub>), 70.4 (CH), 109.4, 114.4, 117.0, 122.5 (Ar), 130.1 (C-7a), 131.2, 136.7, 139.5 (Ar), 148.7 (C-3a), 150.9 (Ar), 156.4, 156.6 (Ar, C-7), 158.6 (C-5). **Análisis elemental** (%) para

C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 62.06; H, 4.63; N, 24.12. Encontrado: C, 61.70; H, 4.61; N, 23.78.

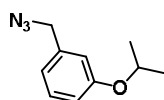
### 3-(3'-Isopropoxifenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-5,7(6H,4H)-diona (3.22)



A una disolución de **3.20a** (120 mg, 0.50 mmol) en DMF (2.5 mL) se añade *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (89 mg, 0.55 mmol). La mezcla se calienta a 90 °C durante la noche. Se concentra a sequedad y se suspende en acetona. El precipitado que aparece se filtra

obteniéndose 81 mg (56%) de **3.22** como un sólido blanco. **Pf** 286-288 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 288 (*M*+ *H*)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.25 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.63 (sept, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH), 6.97 (m, 1H, H-4'), 7.31 (s, 1H, H-2'), 7.40 (m, 2H, H-5', H-6'), 8.34 (s, 1H, N<sup>4</sup>H), 10.63 (s, 1H, N<sup>6</sup>H). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 22.2 (CH<sub>3</sub>), 70.1 (CH), 110.0, 115.3, 116.2 (Ar), 121.0 (C-7a), 130.8 (Ar), 135.2 (C-3a), 136.5 (Ar), 154.3 (C-5), 157.5 (C-7), 158.3 (Ar). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>. Calculado: C, 54.35; H, 4.56; N, 24.38. Encontrado: C, 54.22; H, 4.65; N, 24.21.

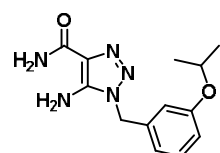
### 1-(Azidometil)-3-isopropoxibenceno (3.24)



A una disolución de **3.23** (185 mg, 1.11 mmol) en DMF anhidra (1.4 mL) se le añade DMAP (163 mg, 1.34 mmol) y CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl (104 μL, 1.34 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 h.

Después, se adiciona NaN<sub>3</sub> y se agita a temperatura ambiente durante 4 h más. La reacción se diluye con agua (20 mL) y se extrae con éter etílico (4 x 10 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. Se obtienen 226 mg (89%) de **3.24** como un aceite. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.25 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.38 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.61 (hept, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 6.89 (m, 3H, H-2, H-4, H-6), 7.28 (pt, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5).

### 5-Amino-1-(3'-isopropoxibencil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (3.25)

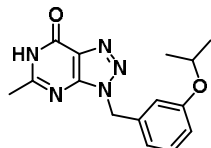


Sobre una suspensión de NaH (60% en aceite mineral, 37 mg, 1.55 mmol) en DMF anhidra (1.4 mL) a 0 °C, se adiciona una disolución de cianoacetamida (79 mg, 0.94 mmol) en DMF anhidra (1.4 mL) y se agita a 0 °C durante 1 h. A continuación se añade lentamente a 0 °C

una disolución de **3.24** (196 mg, 0.86 mmol) en DMF anhidra (1.4 mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Se concentra a sequedad y el crudo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol, 20:1) obteniéndose 183 mg (77%) de **3.25** como un sólido blanco. **Pf** 171-173 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 276

(M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.54 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 5.35 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.38 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.71 (m, 2H, H-2', H-6'), 6.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 7.08 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 7.23 (pt, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 7.45 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>).

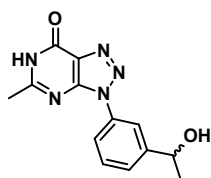
### 3-(3-Isopropoxibencil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona (3.26)



A una disolución de Na (41 mg, 1.80 mmol) en etanol (3.6 mL) se añade **3.25** (100 mg, 0.36 mmol) y acetato de etilo (230 μL, 1.45 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 8 h. Después, la mezcla se concentra a sequedad. El crudo se disuelve en agua y se acidifica por adición de ácido acético. Se filtra el precipitado obteniéndose 81 mg (75%) de **3.26** como un sólido blanco. **Pf** 186-187 °C. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 300 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.22 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.56 (sept, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH), 5.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.72 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7.22 (pt, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5'). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 22.1 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>3</sub>), 50.0 (CH<sub>2</sub>), 69.8 (CH), 115.6, 115.6, 120.1 (Ar), 128.7 (C-7a), 130.6, 137.7 (Ar), 149.7 (C-3a), 156.6 (C-5), 158.3 (C-7), 160.7 (Ar). **Análisis elemental** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 60.19; H, 5.72; N, 23.40. Encontrado: C, 60.24; H, 6.01; N, 23.68.

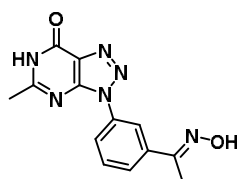
## 6.5. Síntesis de compuestos modificados en el grupo acetilo del cabeza de serie 3.8

### (*R/S*) 3-(3'-(1-Hidroxietil)fenil)-5-metil-3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-ona (3.27a,b)



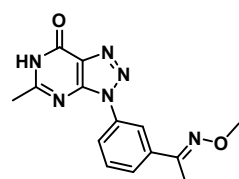
A una disolución de **3.8** (80 mg, 0.30 mmol) en una mezcla de THF/DMF anhidra (1:1) (2.0 mL) se añade NaBH<sub>4</sub> (22 mg, 0.59 mmol). La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 30 min y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol) obteniéndose 58 mg (72%) de **3.27a,b**. **EM** (ES, modo positivo): *m/z* 272 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.39 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.85 (q, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH), 5.40 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, OH), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.59 (pt, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 7.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.97 (s, 1H, H-2'), 12.73 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 22.1 (CH<sub>3</sub>), 26.3 (CHCH<sub>3</sub>), 68.1 (CH), 119.7, 121.0, 126.4 (Ar), 129.2 (C-7a), 129.7, 135.5 (Ar), 149.1 (C-3a), 149.8 (Ar), 156.3 (C-5), 160.9 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 57.56; H, 4.83; N, 25.82. Encontrado: C, 57.56; H, 4.96; N, 25.61.

**(E)-3-(3'-(1-(Hidroxiimino)etil)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.28a)**



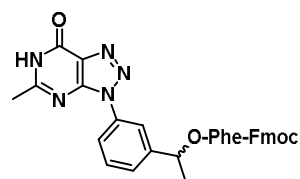
A una disolución de **3.8** (130 mg, 0.48 mmol) en etanol (5 mL) se añade el clorohidrato de hidroxilamina (68 mg, 0.96 mmol) y la mezcla se calienta en el microondas a 80 °C durante 1 h. Se filtra y el precipitado se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 104 mg (76%) de **3.28a** como un sólido. **Pf** 289-291 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  285 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OH})$ ), 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.68 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 7.82 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, H-4'), 8.01 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, H-6'), 8.30 (s, 1H, H-2'), 11.46 (s, 1H, N-OH), 12.75 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 21.2 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OH})$ ), 22.3 ( $\text{CH}_3$ ), 119.7, 123.0, 126.9 (Ar), 129.5 (C-7a), 130.5, 136.1, 139.0 (Ar), 149.4 (C-3a), 152.7 (C-5), 156.4 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OH})$ ), 161.3 (C-7). **Análisis elemental** (%) para  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$ . Calculado: C, 54.93; H, 4.25; N, 29.56. Encontrado: C, 54.91; H, 4.19; N, 29.38.

**(E)-3-(3'-(1-(Metoxiimino)etil)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.28b)**



A una disolución de **3.8** (123 mg, 0.45 mmol) en etanol (5 mL) se añade el clorohidrato de *N*-metilhidroxilamina (77 mg, 0.91 mmol) y la mezcla se calienta al microondas a 80 °C durante 1 h. Se filtra y el precipitado se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol). Se obtienen 103 mg (77%) de **3.28b** como un sólido. **Pf** 272-274 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  299 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OH})$ ), 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.96 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.70 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 7.83 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, H-4'), 8.07 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, H-6'), 8.32 (s, 1H, H-2'), 12.76 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 13.0 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OCH}_3)$ ), 22.3 ( $\text{CH}_3$ ), 62.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 119.9, 123.4, 127.0 (Ar), 129.5 (C-7a), 130.6, 136.1, 138.0 (Ar), 149.5 (C-3a), 153.9 (C-5), 156.4 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}(\text{OCH}_3)$ ), 161.3 (C-7). **Análisis elemental** (%) para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_2$ . Calculado: C, 56.37; H, 4.73; N, 28.17. Encontrado: C, 56.31; H, 4.80; N, 28.04.

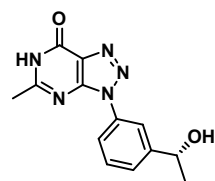
**(R,S)/(S,S) 3-(3'-(1-O-[N-((Fluoren-9-il)metoxicarbonil)-L-fenilalanil]hidroxietil)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.29a,b)**



A una disolución de Fmoc-Phe-OH (930 mg, 2.41 mmol) en DMF anhidra (2 mL) se añade diisopropilcarbodiimida (DIC) (180 µl, 1.15 mmol) y la mezcla se agita durante 30 min a 0 °C.

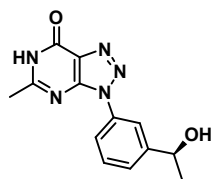
A continuación se adiciona una disolución de **3.27a,b** (131 mg, 0.48 mmol) en DMF anhidra (3 mL), DMAP (12 mg, 0.10 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se diluye con diclorometano (20 mL). La fase orgánica se lava con ácido cítrico al 5% (15 mL), una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (15 mL) y salmuera (15 mL), se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se evapora. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash usando como eluyente diclorometano/MeOH (20:1). Se obtienen 241 mg (80%) de **3.29a,b** como un sólido blanco. **EM** (ES, positivo): m/z 627 (M+1)<sup>+</sup>. La mezcla de diastereómeros se separó por HPLC semipreparativo en una columna Sunfire C-18 (150 mm x 19 mm x 5 µm) con flujo de 24 mL/min, empleando un método isocrático con una mezcla de 45% de ACN con 0.1% de ácido fórmico y de un 55% de agua durante 70 min. Se obtuvo el compuesto **3.29a** (tiempo de retención 59.4 min) con un 24% de rendimiento como un sólido blanco, mientras que el **3.29b** (tiempo de retención 62.9 min) se obtuvo con un 22% de rendimiento como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN **3.29a** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.55 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.16 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 4.36 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 4.70 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, α-CH), 5.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 5.96 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 7.12 (m, 2H, Ar), 7.23 (m, 5H, Ar), 7.36 (m, 3H, Ar), 7.52 (m, 3H, Ar), 7.72 (m, 2H, Ar), 8.05 (m, 2H, Ar), 11.96 (s, 1H, NH). <sup>1</sup>H RMN **3.29b** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.07 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 4.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, CHCH<sub>2</sub>), 4.36 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>), 4.73 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, α-CH), 5.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 6.02 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 6.91 (m, 2H, Ar), 7.11 (m, 3H, Ar), 7.28 (m, 2H, Ar), 7.38 (m, 3H, Ar), 7.54 (m, 3H, Ar), 7.73 (m, 2H, Ar), 8.10 (m, 2H, Ar), 12.03 (s, 1H, NH).

**(R) 3-(3'-(1-Hidroxietil)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6H)-ona (3.27a)**



A una disolución de **3.29a** (36 mg, 0.06 mmol) en THF (1 mL) se añade otra disolución de LiOH (10 mg, 0.32 mmol) en agua (1 mL) y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1) obteniéndose 13 mg de **3.27a** (67%) como un sólido blanco. **EM** (ES, modo positivo): m/z 272 (M+H)<sup>+</sup>. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los descritos en el epígrafe de la mezcla **3.27a,b**.

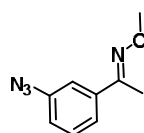
**(S) 3-(3'-(1-Hidroxietil)fenil)-5-metil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.27b)**



A una disolución de **3.29b** (33 mg, 0.05 mmol) en THF (1 mL) se añade otra disolución de LiOH (10 mg, 0.31 mmol) en agua (1 mL) y se agita durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a sequedad y el crudo se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1) obteniéndose 8 mg de **3.27b** (57%) como un sólido blanco. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  272 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN son idénticos a los descritos en el epígrafe de la mezcla **3.27a,b**.

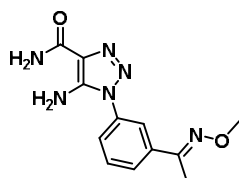
**6.6. Modificaciones en el compuesto 3.28b**

**(E)-1-(3-Azidofenil)etanona O-metil oxima (3.32)**



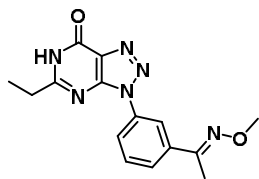
Sobre una disolución de **3.31**<sup>59</sup> (100 mg, 0.62 mmol) en etanol (5 mL) se añade el clorohidrato de metoxiamina (104 mg, 1.24 mmol). La mezcla se calienta al microondas a 80 °C durante 1 h. La reacción se concentra a sequedad. El crudo se disuelve en diclorometano y se lava con salmuera. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidra, se filtra y se concentra a sequedad. Se obtienen 336 mg (88 %) de **3.32** como un aceite anaranjado. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.16 (ddd, *J* = 6.7, 2.2, 2.1 Hz, 1H, H-4), 7.31 (m, 1H, H-5), 7.44 (m, 2H, H-2, H-6).

**(E)-5-Amino-1-(3'-(1-(metoxiimino)etil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carboxamida (3.33)**



Sobre una suspensión de NaH (60% en aceite mineral, 43 mg, 1.78 mmol) en DMF anhidra (1.7 mL) a 0 °C se añade una disolución de cianoacetamida (92 mg, 1.09 mmol) en DMF anhidra (1.7 mL) y se agita a 0 °C durante 1 h. A continuación se añade lentamente a 0 °C una disolución de **3.32** (189 mg, 0.99 mmol) en DMF anhidra (1.7 mL). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentra a sequedad y el crudo se purifica por cromatografía flash (diclorometano/metanol, 20:1) obteniéndose 330 mg (79%) de **3.33** como un sólido blanco. **Pf** 155-157 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  275 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.22 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 7.60 (m, 3H, CONH<sub>2</sub>, H-5, H-4), 7.78 (m, 2H, H-2, H-6). **Análisis elemental** (%) para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 52.55; H, 5.14; N, 30.64. Encontrado: C, 52.76; H, 5.40; N, 30.83.

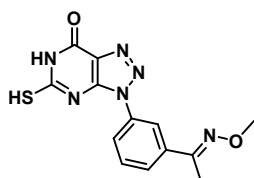
**(E)-5-Etil-3-(3'-(1-(metoxiimino)etil)fenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.34a)**



Procedimiento 1: sobre una disolución de Na (42 mg, 1.82 mmol) en etanol (3.6 mL) se añade **3.33** (100 mg, 0.36 mmol) y propionato de etilo (168  $\mu$ L, 1.46 mmol). La reacción se calienta al microondas a 90 °C durante 1 h. La mezcla se concentra a sequedad. El crudo se disuelve en agua y se acidifica por adición de ácido acético. El precipitado se filtra y se analiza por HPLC-MS. El análisis indicó la presencia de 2 productos que se asignaron tentativamente como **3.34a** (30%) y el isómero Dimroth del producto de partida **3.34b** (70%). El sólido obtenido se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 10:1) obteniéndose 29 mg (26%) de **3.34a** como un sólido blanco.

Procedimiento 2: sobre una disolución de **3.33** (300 mg, 1.09 mmol) en THF seco (11.0 mL) se adiciona  $t$ BuOK en THF 1 M (1.6 mL, 1.64 mmol) y propionato de etilo (505  $\mu$ L, 4.38 mmol). La reacción se calienta al microondas a 90 °C durante 30 min. La mezcla se disuelve en agua y se trata con ácido acético. El precipitado resultante se filtra obteniéndose 245 mg (72%) de **3.34a** como un sólido blanco. **Pf** 251-252 °C. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  313 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.  **$^1H$  RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.26 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.73 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.68 (pt,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, H-5'), 7.80 (m, 1H, H-4'), 8.10 (ddd,  $J$  = 7.9, 2.0, 1.0 Hz, 1H, H-6'), 8.49 (pt,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, H-2'), 12.73 (s, 1H, NH).  **$^{13}C$  RMN** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.9 (CH<sub>3</sub>C=NO), 28.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.5 (OCH<sub>3</sub>), 119.3, 122.7, 126.8 (Ar), 129.7 (C-7a), 130.6, 136.3, 137.8 (Ar), 149.4 (C-3a), 153.8 (CH<sub>3</sub>C=NO), 156.5 (C-5), 165.2 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 57.68; H, 5.16; N, 26.91. Encontrado: C, 57.48; H, 4.93; N, 27.05.

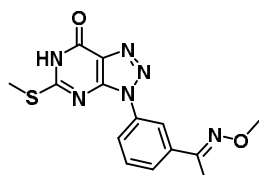
**(E)-3-(3'-(1-(Metoxiimino)etil)fenil)-5-mercapto-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(4H)-ona (3.35)**



Sobre una disolución de **3.33** (30 mg, 0.11 mmol) en THF seco (1.1 mL) se añade  $t$ BuOK en THF (1.0 M, 0.17 mmol, 170  $\mu$ L) y CS<sub>2</sub> (200  $\mu$ L, 3.32 mmol). La reacción se calienta al microondas a 120 °C durante 2 h. La mezcla se disuelve en agua, se trata con ácido acético y se concentra a sequedad. El crudo se tritura con  $t$ BuOH obteniéndose 31 mg (86%) de **3.35** como un sólido blanco. **Pf** > 300 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  317 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.  **$^1H$  RMN** (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.68 (pt,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 7.71 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 8.20 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H-6'), 8.31 (s, 1H, H-2'), 10.95 (s, 1H, NH).  **$^{13}C$  RMN** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$

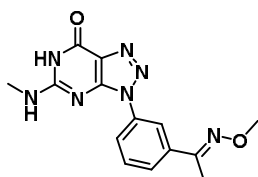
13.1 (CH<sub>3</sub>), 62.5 (OCH<sub>3</sub>), 118.8, 122.4, 125.7 (Ar), 127.4 (C-7a), 130.2, 137.2, 137.7 (Ar), 151.7 (C-3a), 154.2 (CH<sub>3</sub>C=NO), 156.9 (C-7), 180.7 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S. Calculado: C, 49.36; H, 3.82; N, 26.57; S, 10.14. Encontrado: C, 49.18; H, 3.95; N, 26.54; S, 10.06.

**(E)-5-Metiltio-3-(3'-(1-(metoxiimino)etil)fenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.36)**



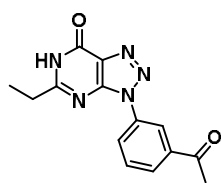
Sobre una disolución de **3.35** (228 mg, 0.72 mmol) en DMF anhidra (3.6 mL) se añade yodometano (54 µL, 0.87 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Se filtra el precipitado que aparece y se lava con metanol obteniéndose 143 mg (60%) de **3.36** como un sólido beige. **Pf** 277-279 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 331 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.65 (pt, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5'), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 8.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-6'), 8.59 (s, 1H, H-2'), 10.95 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.6 (CH<sub>3</sub>), 14.0 (SCH<sub>3</sub>), 62.3 (OCH<sub>3</sub>), 118.2, 122.0, 126.3 (Ar), 128.6 (C-7a), 130.4, 136.2, 137.6 (Ar), 148.5 (C-3a), 153.6 (CH<sub>3</sub>C=NO), 156.3 (C-7), 164.7 (C-5). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S. Calculado: C, 50.90; H, 4.27; N, 25.44; S, 9.71. Encontrado: C, 50.75; H, 4.46; N, 25.40; S, 9.81.

**(E)-5-(Metilamino)-3-(3'-(1-(metoxiimino)etil)fenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.37)**

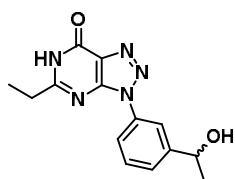


Sobre una suspensión de **3.36** (60 mg, 0.18 mmol) en DMF anhidra (0.4 mL) se añade MeNH<sub>2</sub> en metanol 2N (1.4 mL). Se calienta por irradiación al microondas a 150 °C durante 1 h. Se filtra el precipitado que aparece obteniéndose 21 mg (38%) de **3.37** como un sólido blanco. **Pf** 286-288 °C. **EM** (ES, modo positivo): m/z 314 (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.91 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.65 (m, 2H, H-5', H-6'), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 8.70 (s, 1H, H-2'). **<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.6 (CH<sub>3</sub>), 25.9 (NCH<sub>3</sub>), 62.2 (OCH<sub>3</sub>), 117.7, 121.0, 125.2, 125.8 (Ar), 130.1 (C-7a), 137.1, 137.4 (Ar), 151.4 (C-3a), 153.7 (CH<sub>3</sub>C=NO), 157.8 (C-5), 159.2 (C-7). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 53.67; H, 4.83; N, 31.29. Encontrado: C, 53.60; H, 4.62; N, 31.36.



**3-(3'-Acetilfenil)-5-etil-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.38)**

A una disolución de **3.34a** (100 mg, 0.32 mmol) en dioxano (1 mL) se añade HCl 6N (1 mL). La reacción se calienta por irradiación al MW a 120 °C durante 1h. La mezcla se filtra. El sólido resultante se disuelve en diclorometano y se precipita con hexano obteniéndose 20 mg (33%) de **3.38** como un sólido blanco. **Pf** > 240 °C (descomp). **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  284 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.25 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.66 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 2.73 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.81 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-5'), 8.11 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 8.32 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 8.66 (s, 1H, H-2'), 12.74 (s, 1H, NH). **<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  11.4 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (COCH<sub>3</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>), 121.4, 126.4, 128.9 (Ar), 129.5 (C-7a), 130.8, 136.2, 138.4 (Ar), 149.3 (C-3a), 156.3 (C-5), 165.2 (C-7), 197.4 (COCH<sub>3</sub>). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 59.36; H, 4.63; N, 24.72. Encontrado: C, 59.16; H, 4.74; N, 24.50.

**(+/-) 5-Etil-3-(3-(1-hidroxietil)fenil)-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pirimidin-7(6H)-ona (3.39a,b)**

A una disolución de **3.38** (18 mg, 0.06 mmol) en DMF anhidra (0.5 mL) se añade NaBH<sub>4</sub> (5 mg, 0.13 mmol). La reacción se calienta al microondas a 100 °C durante 30 min y se concentra a sequedad. El crudo se purifica por CCTLC (diclorometano/metanol, 20:1) obteniéndose 15 mg (88%) de **3.39a,b**. **EM** (ES, modo positivo):  $m/z$  286 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  1.24 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.37 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 2.72 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.83 (m, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 5.39 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 1H, OH), 7.49 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.58 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.89 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Ar), 8.05 (s, 1H, Ar), 12.70 (s, 1H, NH). **Análisis elemental** (%) para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>. Calculado: C, 58.94; H, 5.30; N, 24.55. Encontrado: C, 59.66; H, 5.54; N, 24.50.

**6.7. Ensayos de actividad antiviral en células Vero**

Los virus utilizados han sido: virus Chuikungunya cepa 899, virus Sindbis cepa HRsp y virus del bosque Semliki. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos según procedimientos descritos.<sup>37</sup> La incubación se realizó durante 6-7 días, tiempo en el que se detecta el mayor efecto citopático del virus en células control infectadas no tratadas. A continuación se aspira el medio de cultivo y se añaden 75  $\mu$ L de una disolución al 5% de un compuesto de tetrazolio (MTS) en fenol y se incuba por 1.5 h. A continuación se mide la absorbancia a 498 nm. Las lecturas obtenidas se transforman en porcentajes

### *Parte experimental*

respecto al control, y se determinan los valores de  $CE_{50}$  y  $CC_{50}$  a partir de curvas dosis-respuesta. En los pocillos donde se detecta un efecto antiviral superior al 50%, se realiza una inspección al microscopio para detectar posibles efectos citopáticos sobre la célula hospedadora o posibles cambios morfológicos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Powers, A. M.; Logue, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* **2007**, 88, 2363–2377.
- (2) Staples, J. E.; Breiman, R. F.; Powers, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* **2009**, 49, 942–948.
- (3) Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* **2009**, 393, 183–197.
- (4) Kondekar, S.; Gogtay, N. Why Chikungunya is called Chikungunya. *J Postgrad Med* **2006**, 52, 307.
- (5) Robinson M. C. An epidemic of virus disease in Southern province, Tanganyika territory, in 1952-53 I. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1955**, 49, 2832.
- (6) Lumsden, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1955**, 49, 33–57.
- (7) Lahariya, C.; Pradhan, S. K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. *J Vector Borne Dis* **2006**, 43, 151–160.
- (8) Mackenzie, J. S.; Chua, K. B.; Daniels, P. W.; Eaton, B. T.; Field, H. E.; Hall, R. A.; Halpin, K.; Johansen, C. A.; Kirkland, P. D.; Lam, S. K.; McMinn, P.; Nisbet, D. J.; Paru, R.; Pyke, A. T.; Ritchie, S. A.; Siba, P.; Smith, D. W.; Smith, G. A.; van den Hurk, A. F.; Wang, L. F.; Williams, D. T. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerg Infect Dis* **2001**, 7, 497–504.
- (9) PIALOUX, G.; GAÜZÈRE, B.-A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis* **2007**, 7, 319–327.
- (10) Soper, F. L. *Aedes aegypti* and yellow fever. *Bull World Health Organ* **1967**, 36, 521–527.
- (11) Singh, S. K.; Unni, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Rev Med Virol* **2011**, 21, 78–88.
- (12) March, B.; Ocean, I.; January, F. Chikungunya disease outbreak , Reunion Island. *Emerg Infect Dis* **2006**, 12, 2005–2006.
- (13) Vazeille, M.; Moutailler, S.; Coudrier, D.; Rousseaux, C.; Khun, H.; Huerre, M.; Thiria, J.; Dehecq, J. S.; Fontenille, D.; Schuffenecker, I.; Despres, P.; Failloux, A. B. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* **2007**, 2, e1168.

- (14) Tsetsarkin, K. A.; Vanlandingham, D. L.; McGee, C. E.; Higgs, S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* **2007**, *3*, e201.
- (15) Thiboutot, M. M.; Kannan, S.; Kawalekar, O. U.; Shedlock, D. J.; Khan, A. S.; Sarangan, G.; Srikanth, P.; Weiner, D. B.; Muthumani, K. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4*, e623.
- (16) Couderc, T.; Lecuit, M. Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. *Microbes Infect* **2009**, *11*, 1197–1205.
- (17) Mohan, A. Chikungunya fever: clinical manifestations & management. *Indian J Med Res* **2006**, *124*, 471–474.
- (18) Fourie, E. D.; Morrison, J. G. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. *S Afr Med J* **1979**, *56*, 130–132.
- (19) Malvy, D.; Ezzedine, K.; Mamani-Matsuda, M.; Autran, B.; Tolou, H.; Receveur, M.C.; Pistone, T.; Rambert, J.; Moynet, D.; Mossalayi, D. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. *BMC Infect Dis* **2009**, *9*, 1–7.
- (20) Chia, P.; Ng, M. M.; Jang, J.; Chu, H. Chikungunya fever: a review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status. In *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*; Badajoz, Spain : Formatex Research Center, 2010, Ed.; 2010; pp. 597–606.
- (21) Queyriaux, B.; Simon, F.; Grandadam, M.; Michel, R.; Tolou, H.; Boutin, J. P. Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis* **2008**, *8*, 2–3.
- (22) Barau, G.; Michault, A.; Bintner, M.; Randrianaivo, H.; Choker, G.; Ge, P.; Schuffenecker, I.; Lenglet, Y.; Touret, Y.; Bouveret, A.; Grivard, P.; Roux, K. L. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med* **2008**, *5*, e60.
- (23) Ramful, D.; Carbonnier, M.; Pasquet, M.; Bouhmani, B.; Ghazouani, J.; Noormahomed, T.; Beullier, G.; Attali, T.; Samperiz, S.; Fourmaintraux, A.; Alessandri, J. L. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr Infect Dis J* **2007**, *26*, 811–815.
- (24) Borgherini, G.; Poubeau, P.; Staikowsky, F.; Lory, M.; Moullec, N. Le; Becquart, J. P.; Wengling, C.; Michault, A.; Paganin, F. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clin Infect Dis* **2007**, *44*, 1401–1407.
- (25) Economopoulou, A.; Dominguez, M.; Helynck, B.; Sissoko, D.; Wichmann, O.; Quenel, P.; Germonneau, P.; Quatresous, I. Atypical Chikungunya virus

- infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect* **2009**, *137*, 534–541.
- (26) Arpino, C.; Curatolo, P.; Rezza, G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. *Rev Med Virol* **2009**, *19*, 121–129.
- (27) Wielanek, A. C.; Monredon, J. De; Amrani, M. El; Roger, J. C.; Serveaux, J. P. Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. *Neurology* **2007**, *69*, 2105–2107.
- (28) Singh, S. S.; Manimunda, S. P.; Sugunan, A. P.; Sahana; Vijayachari, P. Four cases of acute flaccid paralysis associated with chikungunya virus infection. *Epidemiol Infect* **2008**, *136*, 1277–1280.
- (29) Schwartz, O.; Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* **2010**, *8*, 491–500.
- (30) Ravichandran, R.; Manian, M. Brief original article ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *J Infect Developing Countries* **2008**, *2*, 140–142.
- (31) Bréhin, A. C.; Casadémont, I.; Frenkiel, M. P.; Julier, C.; Sakuntabhai, A.; Desprès, P. The large form of human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against Chikungunya virus. *Virology* **2009**, *384*, 216–222.
- (32) Oliva, C. F.; Jacquet, M.; Gilles, J.; Lemperiere, G.; Maquart, P.-O.; Quilici, S.; Schooneman, F.; Vreysen, M. J. B.; Boyer, S. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PLoS One* **2012**, *7*, e49414.
- (33) Levitt, N. H.; Ramsburg, H. H.; Hasty, S. E.; Repik, P. M.; Cole, F. E.; Lupton, H. W. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine* **1986**, *4*, 157–162.
- (34) Plante, K.; Wang, E.; Partidos, C. D.; Weger, J.; Gorchakov, R.; Tsetsarkin, K.; Borland, E. M.; Powers, A. M.; Seymour, R.; Stinchcomb, D. T.; Osorio, J. E.; Frolov, I.; Weaver, S. C. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathog* **2011**, *7*, e1002142.
- (35) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Eydoux, C.; Guillemot, J. C.; Canard, B.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Flacourtosides A-F, phenolic glycosides isolated from *Flacourtia ramontchi*. *J Nat Prod* **2012**, *75*, 752–758.
- (36) Bourjot, M.; Leyssen, P.; Eydoux, C.; Guillemot, J. C.; Canard, B.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Chemical constituents of *Anacolosa pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1076–1080.
- (37) Bourjot, M.; Delang, L.; Nguyen, V. H.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and

- selective inhibitors of Chikungunya virus replication. *J Nat Prod* **2012**, *75*, 2183–2187.
- (38) Allard, P. M.; Martin, M. T.; Dau, M. E. T. H.; Leyssen, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Trigocherrin A, the first natural chlorinated daphnane diterpene orthoester from *Trigonostemon cherrieri*. *Org Lett* **2012**, *14*, 342–345.
- (39) Bassetto, M.; De Burghgraeve, T.; Delang, L.; Massarotti, A.; Coluccia, A.; Zonta, N.; Gatti, V.; Colombano, G.; Sorba, G.; Silvestri, R.; Tron, G. C.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Brancale, A. Computer-aided identification, design and synthesis of a novel series of compounds with selective antiviral activity against chikungunya virus. *Antiviral Res* **2013**, *98*, 12–18.
- (40) Aguado, L.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J. Microwave-assisted synthesis of 9-arylpurines. *J Comb Chem* **2009**, *11*, 210–212.
- (41) Send, D.; Dasgupta, A.; Sengupta, P. Synthesis of 2,6-disubstituted 9-arylpurines, 9-aryl-8-azapurines & related 5-phenylazopyrimidines & their biological activity. *Indian J chem Sect B Org incl Med* **1985**, *24*, 952–958.
- (42) Aguado, L.; Thibaut, H. J.; Priego, E. M.; Jimeno, M. L.; Camarasa, M. J.; Neyts, J.; Pérez-Pérez, M. J. 9-Arylpurines as a novel class of enterovirus inhibitors. *J Med Chem* **2010**, *53*, 316–324.
- (43) Barili, P. L.; Biagi, G.; Livi, O.; Scartoni, V. A facile “one pot” synthesis of 2,9-disubstituted 8-azapurin-6-ones (3,5-disubstituted 7-hydroxy-3 H -1,2,3-triazolo[4,5- d ]pyrimidines). *J Heterocycl Chem* **1985**, *22*, 1607–1609.
- (44) Hu, M.; Li, J.; Yao, S. Q. In situ “click” assembly of small molecule matrix metalloprotease inhibitors containing zinc-chelating groups. *Org Lett* **2008**, *10*, 5529–5531.
- (45) Bertelli, L.; Biagi, G.; Calderone, V.; Giorgi, I.; Livi, O.; Scartoni, V.; Barili, P. L. 1-(1,2,3-triazol-4-yl)-benzimidazolones, a new series of heterocyclic derivatives. *J Heterocyclic Chem* **2000**, *37*, 1169–1173.
- (46) Loidreau, Y.; Marchand, P.; Dubouilh-Benard, C.; Nourrisson, M.-R.; Duflos, M.; Lozach, O.; Loaëc, N.; Meijer, L.; Besson, T. Synthesis and biological evaluation of N-arylbenzo[b]thieno[3,2-d]pyrimidin-4-amines and their pyrido and pyrazino analogues as Ser/Thr kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **2012**, *58*, 171–183.
- (47) Baines, K. M.; Rourke, T. W.; Vaughan, K.; Hooper, D. L. 5-(Arylamino)-1,2,3-triazoles and 5-amino-1-aryl-1,2,3-triazoles from 3-(cyanomethyl)triazenes. *J Org Chem* **1981**, *46*, 856–859.
- (48) Miyashita, A.; Fujimoto, K.; Okada, T.; Higashino, T. Synthesis of fused pyrimidinones by reaction of aminoarenecarboxamide with esters; Preparation of

- pyrrolo[2,3-d]-, thieno[2,3-d]-, isoxazolo[5,4-d]-, and 1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidinones, and quinazolones. *Heterocycles* **1996**, *42*, no.
- (49) Markwalder, J. A.; Arnone, M. R.; Benfield, P. A.; Boisclair, M.; Burton, C. R.; Chang, C. H.; Cox, S. S.; Czerniak, P. M.; Dean, C. L.; Doleniak, D.; Grafstrom, R.; Harrison, B. A.; Kaltenbach, R. F.; Nugiel, D. A.; Rossi, K. A.; Sherk, S. R.; Sisk, L. M.; Stouten, P.; Trainor, G. L.; Worland, P.; Seitz, S. P. Synthesis and biological evaluation of 1-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* **2004**, *47*, 5894–5911.
- (50) Giorgi, I.; Bianucci, A. M.; Biagi, G.; Livi, O.; Scartoni, V.; Leonardi, M.; Pietra, D.; Coi, A.; Massarelli, I.; Nofal, F. A.; Fiamingo, F. L.; Anastasi, P.; Giannini, G. Synthesis, biological activity and molecular modelling of new trisubstituted 8-azaadenines with high affinity for A1 adenosine receptors. *Eur J Med Chem* **2007**, *42*, 1–9.
- (51) Kuleshov, K. V.; Rodin, O. G.; Perevalov, V. P. Synthesis of novel 5-piperidyl-substituted 7-hydroxy-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidines. *Chem Heterocycl Comp* **2006**, *42*, 276–290.
- (52) Corey, E. J.; Shibata, S.; Bakshi, R. K. An efficient and catalytically enantioselective route to (S)-(-)-phenyloxirane. *J Org Chem* **1988**, *8*, 2861–2863.
- (53) Mathre, D. J.; Jones, T. K.; Xavier, L. C.; Blacklock, T. J.; Reamer, R. A.; Mohan, J. J.; Jones, E. T. T.; Hoogsteen, K.; Baum, M. W.; Grabowski, E. J. J. A practical enantioselective synthesis of alpha,alpha-diaryl-2-pyrrolidinemethanol. Preparation and chemistry of the corresponding oxazaborolidines. *J Org Chem* **1991**, 751–762.
- (54) Masui, M.; Shioiri, T. A practical method for asymmetric borane reduction of prochiral ketones using chiral amino alcohols and trimethyl borate. *Synlett* **1997**, *3*, 273–274.
- (55) Yanagi, T.; Kikuchi, K.; Takeuchi, H.; Ishikawa, T.; Nishimura, T.; Kamijo, T. Asymmetric borane reduction of prochiral ketones using aluminum triethoxide and chiral amino alcohols. *Chem Lett* **1999**, *11*, 1203–1204.
- (56) Hollis, F. J. NMR through the looking glass: uses of NMR spectroscopy in the analysis and synthesis of chiral pharmaceuticals. <http://homepage.ntlworld.com/chemist/s442.pdf>.
- (57) Rao, P. N. P.; Uddin, M. J.; Knaus, E. E. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of 3,4,6-triphenylpyran-2-ones as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Med Chem* **2004**, *47*, 3972–3990.

## Bibliografía

- (58) Aguado, L.; Canela, M. D.; Thibaut, H. J.; Priego, E. M.; Camarasa, M. J.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Pérez-Pérez, M. J. Efficient synthesis and anti-enteroviral activity of 9-arylpurines. *Eur J Med Chem* **2012**, *49*, 279–288.
- (59) Chakraborty, A.; Dey, S.; Sawoo, S.; Adarsh, N. N.; Sarkar, A. Regioselective 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azides with alkoxy alkynyl Fischer carbene complexes. *Organometallics* **2010**, *29*, 6619–6622.



## CONCLUSIONES GENERALES

Como ya se comentó en la Introducción general, el carácter multidisciplinar de la química médica hace que la investigación en este campo se realice muy a menudo en colaboración con otros grupos. Así, al trabajo de síntesis y caracterización estructural hay que añadir la interpretación de resultados biológicos, resultando una formación multidisciplinar. Los resultados más relevantes de esta Memoria, agrupados por capítulos, se comentan a continuación.

En el Capítulo 1, y con el fin de mejorar la solubilidad acuosa del compuesto antiangiogénico 5'-O-tritilinosina se han abordado distintas aproximaciones para la preparación de profármacos mediante la conjugación con oligopéptidos que puedan ser reconocidos por la enzima CD26 y de este modo liberen el compuesto activo.

- Para la síntesis de conjugados a través de los OHs de las posiciones 2' ó 3' del nucleósido, y utilizando una valina como nexo de unión, se han preparado conjugados tripeptídicos de secuencia Val-Pro-Val, Lys-Pro-Val y Asn-Pro-Val. En una segunda aproximación, y empleando el dipéptido Val-Pro como nexo de unión, se han preparado los conjugados tetrapeptídicos de secuencia Lys-Pro-Val-Pro.
- Sobre los profármacos tripeptídicos obtenidos se han realizado estudios de solubilidad, estudios de estabilidad química en PBS y estudios de estabilidad enzimática frente a la enzima CD26 y en suero humano al 20%. Sobre el profármaco tetrapeptídico se han realizado estudios de solubilidad y estabilidad química, siendo el que presentó un mayor incremento de solubilidad respecto a la 5'-O-tritilinosina, aproximadamente 2000 veces más soluble, si bien su estabilidad química es moderada. Los resultados obtenidos han llevado a proponer la síntesis de nuevos derivados tetrapeptídicos de secuencia Asn-Pro-Val-Pro, en donde se espera combinar una solubilidad, estabilidad química y reconocimiento por CD26 adecuados.
- Se ha preparado un derivado de la 5'-O-tritilinosina modificado en la posición N-1 con un espaciador de glicol y un grupo amino primario terminal, el compuesto **1.29**. Una vez confirmada su actividad antiangiogénica, se ha sintetizado un profármaco incorporando la secuencia Lys-Pro sobre el grupo amino. Este profármaco **1.32** es perfectamente estable en PBS, libera el compuesto patrón (**1.29**) en presencia de la enzima CD26 en tiempos cortos y es 177 veces más

soluble que la 5'-O-tritilinosina. Los ensayos "*in vivo*" realizados hasta el momento no han demostrado la actividad antitumoral deseada. Aun así, el compuesto **1.29** merece ser explorado en otros ensayos así como ser objeto de nuevas modificaciones como la preparación de profármacos tetrapeptídicos.

En el capítulo 2 se recoge la síntesis de 8-aril y 8-piridil inosinas, su estabilidad en distintos pHs, y su evaluación como antivirales y como inhibidores de la enzima purina nucleósido fosforilasa de varios organismos.

- La síntesis se ha llevado a cabo a partir de la 2',3'-O-isopropilideninosina mediante reacción de arilación directa con yoduros de arilo o piridilo catalizada por Pd/Cu. El empleo de la calefacción por microondas ha permitido una reducción muy significativa de los tiempos de reacción. La obtención de estos compuestos con la pureza requerida para su evaluación biológica ha sido posible gracias al empleo de la resina Quadrasil® MP.
- Los estudios de estabilidad realizados a diferentes pHs muestran que las 8-aril y 8-piridil inosinas sintetizadas son perfectamente estables a pHs 7.4 y 5.0, mientras que su vida media a pH = 1.2 es de aproximadamente 5 horas para las 8-arilinosinas y de 10 horas para las 8-piridilinosinas.
- Los compuestos sintetizados no han presentado actividad antiviral ni citotoxicidad a concentraciones de 100 µM.
- Los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33**, portadores de los grupos 3-OMe, 4-CF<sub>3</sub> y 3-CF<sub>3</sub> en el arilo en posición 8, respectivamente, han mostrado una inhibición moderada frente a la enzima purina nucleósido fosforilasa del *Plasmodium falciparum*. Esta inhibición enzimática es además selectiva ya que no se ha observado inhibición de otras PNP (humana, *E. coli* y *Mycoplasma hyorhinis*).
- Se han medido las propiedades fluorescentes de los nucleósidos **2.30**, **2.32** y **2.33**, y sus correspondientes bases. En concreto el compuesto **2.30** se incubó en presencia de la enzima PNP resultando no ser sustrato de la misma.

El capítulo 3 se ha centrado en la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la replicación del virus reemergente chikungunya (CHIKV). En un amplio programa de screening, se identificó un derivado [1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidina como un buen hit dado su bajo peso molecular, su accesibilidad sintética y su novedad estructural respecto a otros inhibidores descritos. En el desarrollo de este trabajo se ha llevado a

cabo el diseño, la síntesis y evaluación antiviral de este compuesto variando sistemáticamente los distintos fragmentos de la molécula.

- Para llevar a cabo estas modificaciones se han empleado dos rutas sintéticas diferentes. Una de ellas estaba puesta a punto por nuestro grupo de investigación a partir de la cual se obtenían las 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*d*]pirimidin-7(6*H*)-onas a través de reacción de anilinas con 4,6-dicloropirimidinas, posterior reacción de las pirimidin-4,5-diaminas con NaNO<sub>2</sub> e hidrólisis del 7-Cl al grupo ceto. La segunda ruta se ha puesto a punto en esta tesis doctoral obteniéndose los compuestos finales a partir de arilazidas, reacción con cianoacetamida y cierre de anillo con distintos ésteres.
- Todos los compuestos sintetizados han sido evaluados frente a células Vero infectadas con el virus de chikungunya. La evaluación de estos compuestos han permitido establecer la necesidad de la presencia de: 1) un sustituyente en la posición *meta* en el anillo aromático (siendo los grupos acetilo, isopropoxi y 1-(metoxiimino)etilo los que mejores datos de actividad han mostrado), 2) el grupo carbonilo en la posición 7, 3) el anillo de triazol y 4) el grupo etilo en posición 5 del heterociclo.
- Los compuestos que mejores resultados de actividad han mostrado son **3.21b** y **3.34a**. Estos han supuesto una mejora entre 20 y 30 veces de la CE<sub>90</sub> respecto a nuestro prototipo (**3.8**). Además, no son citotóxicos y por lo tanto presentan un buen índice de selectividad. Esta baja citotoxicidad ha permitido la selección de cepas virales resistentes cuya secuenciación apunta a una proteína viral como posible diana molecular.





